

Aus der  
Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie am Universitätsklinikum Rostock  
Direktor: Prof. Dr. med. habil. Gustav Steinhoff

**In vitro Charakterisierung des  
kardiomyozytären Differenzierungspotentials verschiedener  
humaner adulter Stammzellen**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock

Vorgelegt von  
**Jana Kristina Oldigs,**  
geb. am 10. Februar 1984 in Lübeck



Rostock, den 29. Mai 2009

urn:nbn:de:gbv:28-diss2010-0034-5

Rigorousum in Rostock, am 09. Februar 2010

Dekan: Prof. Dr. med. habil. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. habil. Gustav Steinhoff, Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie, Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Hüseyin Ince, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin, Abteilung Kardiologie, Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. med. habil. Christof Stamm, Deutsches Herzzentrum Berlin

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht.

Publikation:

Ong L, Li W, **Oldigs JK**, Kaminski A, Gerstmayer B, Piechaczek C, Wagner W, Li RK, Ma N, Steinhoff G.

„Hypoxic/normoxic preconditioning increases endothelial differentiation potential of human bone marrow CD133+ cells.“

Tissue Eng Part C Methods. 2010 Jan 14.

Poster:

**Oldigs JK**, Ong LL, Ma N and Steinhoff G: „Transdifferentiation Potential Of CD133<sup>+</sup> Stem Cells“; 2<sup>nd</sup> International Congress on Stem Cells and Tissue Formation, Dresden, 06.-09.07.2008



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>VI</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>VIII</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>8</b>
2.1 Geräte	8
2.2 Software	9
2.3 Standard- und Pufferlösungen	9
2.4 Zellgewinnung	10
2.4.1 Materialien	10
2.4.2 Zellgewinnung der C <sub>2</sub> C <sub>12</sub>	11
2.4.3 Zellgewinnung der CD133 <sup>+</sup> Stammzellen	11
2.4.4 Analyse der Reinheit der CD133 <sup>+</sup> Zellen	13
2.4.5 Zellgewinnung der hMSC	13
2.5 Zellkultivierung	14
2.5.1 Materialien	14
2.5.2 Zellkultivierung	14
2.6 Immunofärbung	16
2.6.1 Materialien	16
2.6.2 Vorbereitung der Zellen	17
2.6.3 Färbung	17
2.6.4 Auswertung der Zellen	19
2.7 RNA-Isolierung und RT-PCR	20
2.7.1. Materialien	20
2.7.2. RNA-Isolierung	21
2.7.3. Quantifizierung der RNA	22
2.7.4. Reverse Transkription	22
2.7.5. Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	23
2.8. Agarose Gel Elektrophorese	25
2.8.1. Materialien	25
2.8.2. Herstellung und Vorbereitung des Agarose Gels	26
2.8.3. Durchführung der Elektrophorese	26
2.9. Analyse der Zelloberfläche der hMSCs mittels FACS	26
2.9.1. Materialien	26
2.9.2. Vorbereitung der Zellen	27
2.9.3. Durchführung der FACS Analyse	28
2.9.4. Auswertung der FACS Analyse	28
2.10. Analyse der Wachstumsgeschwindigkeit der hMSCs mittels FACS	28
2.10.1. Materialien	28

---

2.10.2.	Vorbereitung der Zellen	28
2.10.3.	FACS Analyse	29
2.11.	Analyse der Kalziumaktivität von NRCM mittels Live-Cell-Imaging	30
2.11.1.	Materialien	30
2.11.2.	Kultivierung der NRCM	30
2.11.3.	Kalzium-Färbung	31
2.11.4.	Analyse mittels Live-Cell-Imaging	31
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>32</b>
3.1.	In vitro Charakterisierung und Untersuchung humaner Mesenchymaler Stammzellen	32
3.1.1.	Lichtmikroskopische Beobachtung	32
3.1.2.	Oberflächenantigen Analyse	34
3.1.3.	Wachstumsvergleich der hMSCs verschiedener Herkunft	37
3.1.4.	Wachstumsvergleich in normoxischer und hypoxischer Umgebung	39
3.1.5.	Oberflächenbehandlung mit 5-Azacytidin	44
3.2.	Ko-Kultivierung von CD133 <sup>+</sup> Stammzellen und C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> Myoblasten der Maus	48
3.2.1.	Reinheitsanalyse der CD133 <sup>+</sup> Stammzellen	48
3.2.2.	Mikroskopische Betrachtung der Komponenten und der Ko-Kultur	48
3.2.3.	RT-PCR Analyse mit der Fragestellung der Differenzierung	50
3.2.4.	Immunfluoreszenzanalyse mit der Fragestellung der Differenzierung	51
3.2.5.	Ausarbeitung einer Positivkontrolle	54
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>57</b>
4.1	Charakterisierung humaner Mesenchymaler Stammzellen	57
4.2	Differenzierungsmöglichkeiten hämatopoetischer CD133 <sup>+</sup> Stammzellen	61
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>66</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>67</b>
	<b>ANHANG</b>	<b>80</b>

---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BM	Knochenmark, engl.: bone marrow
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CB	Nabelschnurblut, engl.: cord blood
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (= Wachstumsmedium)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Durchflusszytometrie, engl.: fluorescence activated cell sorting
hMSC	Humane Mesenchymale Stammzellen
HWZ	Halbwertszeit
BM-SC	Knochenmarkstammzelle, engl.: bone marrow stem cells
MACS	Magnetisch aktivierte Zellsortierung
min	Minuten
NRCM	Neonatale Kardiomyozyten der Ratte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PLA	Fettgewebe, engl.: processed liposuction aspiration
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Runden pro Minute, engl.: rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
s.	siehe
Sek.	Sekunde(n)
sog.	sogenannte/-es/-er
Std.	Stunde(n)
U	Einheiten, engl.: Units
Vgl.	der Vergleich

Zusätzlich gelten die allgemeinen SI-Einheiten und die chemischen Elementsymbole.



## 1 EINLEITUNG

Der Herzinfarkt ist die zweithäufigste Todesursache in Deutschland nach der chronisch ischämischen Herzkrankheit und vor der Herzinsuffizienz. Damit sind Herzkreislauferkrankungen mit 43,7 % nach wie vor Todesursache Nummer eins. Platz zwei belegen die bösartigen Neubildungen mit 25,7 %<sup>1</sup>. Auf Grund der seit 150 Jahren kontinuierlich ansteigenden Lebenserwartung<sup>2</sup> bleiben Erkrankungen des Alters, wie die postischämische Herzinsuffizienz, ein aktuelles Thema in der Medizin.

Beim Herzinfarkt kommt es zu einer irreversiblen Herzmuskelzellnekrose. Diese baut sich in fibrotisches Gewebe um und es entsteht eine Narbe, wodurch es zum Kontraktionsverlust kommt. Das adulte ausdifferenzierte Myokard ist nicht mehr in der Lage neue Zellen in der Weise zu bilden, wie es regenerative Organe, z.B. das Knochenmark, können. Man weiß heute aber, dass das Herz kein „postmitotisches“ Organ ist<sup>3</sup>, was man noch vor einigen Jahren annahm.

Die DNA-Synthese von Herzmuskelzellen findet hauptsächlich *in utero* statt (33 % in der Mitte der Schwangerschaft und nur noch 2 % zum Ende)<sup>4</sup>. Die Herzmuskulatur besteht dennoch ein Leben lang aus alten und jungen Zellen. Die jungen Zellen machen zwar nur  $\frac{1}{5}$  des Myokards aus, haben aber ihre Fähigkeit zur Replikation behalten<sup>5</sup> und können somit in Reaktion auf die Ischämie und den folgenden Herzinfarkt proliferieren. Das menschliche Herz ist also ein „mitotisches“ Organ<sup>6,7</sup>. Die Frage, ob die Zellen aus gewebeständigen Herzstammzellen oder aus zirkulierenden Stammzellen aus dem Knochenmark, die in das Herz migrieren, stammen, ist noch nicht endgültig geklärt. Experimente an Mäusen wiesen nach, dass 0,02 – 0,04 % aller Kardiomyozyten im Infarktgebiet aus Zellen des Knochenmarks stammen<sup>8</sup>. Ergebnisse aus Autopsien von menschlichen Frauenherzen, die zu Lebzeiten eine Knochenmarktransplantation von männlichen Spendern bekommen hatten, zeigten anhand von y-Chromosomen-positiven Kardiomyozyten, dass Zellen extrakardialen Ursprungs in das Herz migriert waren<sup>9</sup>.

Der positive Effekt der Stammzellen in der Behandlung von Herzkrankheiten ist bekannt. Es bleibt jetzt noch herauszufinden, wie man die Regenerationsfähigkeit des Herzen am besten unterstützt, um der postischämischen Herzinsuffizienz vorzubeugen, bzw. sie in ihrer Schwere zu reduzieren. Bei dieser Fragestellung kommen die extrakardialen Stammzellen (Mesenchymale Stammzellen und Knochenmarkstammzellen) zum Tragen und die Frage in wie weit der Wiederaufbau der Herzmuskulatur durch vaskulogenetische oder kardiomyozytäre Faktoren der extrakardialen Stammzellen beeinflusst wird.

### 1.1. Der akute Myokardinfarkt

Der akute Myokardinfarkt (AMI) entsteht in über 90 % der Fälle durch die stenosierende Koronararteriosklerose, selten sind Koronarembolien ausgehend von Thromben in den Herzkammern, endokarditische Vegetationen oder verkalkte Klappen die Ursache. Durch die Ruptur einer arteriosklerotischen Plaque kommt es zu einem thrombotischen Verschluss der Herzkranzgefäße und in Folge dessen zu einem Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf. Daraus resultiert eine Angina pectoris oder ein Myokardinfarkt. Nach 30 - 90 min der Ischämie beginnt das Herzmuskelgewebe zu nekrotisieren. Entzündungszellen migrieren und das Gewebe fibrotisiert. Nach 2-8 Wochen hat sich das ischämische Myokard in eine Narbe umgewandelt. Daraus folgt ein Verlust der kardialen Pumpfunktion, ein ventrikuläres „Remodelling“ und es kommt zur progressiven Dysfunktion. Zusammenfassend ergibt es das Bild einer postischämischen Herzinsuffizienz als häufigste Folge eines AMI.

Die Akuttherapie des AMI hat sich in den letzten 25 Jahren stark verbessert, wodurch die Frühmortalität, die Sterblichkeit innerhalb eines Monats nach AMI, erheblich zurück gegangen ist. Neben den Allgemeinmaßnahmen nach Einweisung ins Krankenhaus wie Intensivüberwachung, Sedierung, Sauerstoffgabe, Analgesierung und medikamentöse Behandlung mit ASS, Clopidogrel,  $\beta$ -Blocker und ACE-Hemmern, ist die Reperfusionstherapie in der heutigen Zeit Goldstandard. Darunter versteht man unter anderem die akute PTCA (=Perkutane Transluminale Coronare Angioplastie). Das ist eine Herzkatheter-geführte mechanische Rekanalisation des stenosierten Gefäßes mit oder ohne anschließender Implantation eines Stents. Eine andere Möglichkeit besteht in der Lysetherapie. Durch intravenöse Gabe eines gerinnselauflösenden Medikamentes wird das Gefäß reperfundiert. Diese Therapie muss innerhalb eines bestimmten Zeitfensters von 3-6 Std gegeben werden und ist somit auch schon prästationär einsetzbar. Eine dritte Variante, die heute jedoch selten in der Akutphase angewandt wird, ist die Bypass-Operation<sup>10</sup>. Auf Grund der zeitlichen Differenz zwischen Koronarokklusion und Reperfusion kann sich trotz dieser Akutmaßnahmen eine Herzinsuffizienz ausbilden<sup>11</sup>. Die Langzeittherapie solcher AMI-Patienten besteht in der Einnahme von Thrombozytenaggregationshemmern wie ASS und Clopidogrel, sowie die Veränderung der Lebensumstände. Das beinhaltet den Verzicht auf Nikotin, Alkohol und übermäßiges Fett in der Nahrung ebenso wie die gute therapeutische Einstellung von häufigen Risiken wie die arterielle Hypertonie und den Diabetes mellitus.

Die postischämische Herzinsuffizienz zu behandeln ist eine der medizinischen Hauptaufgaben der westlichen Industrienationen. Die oben genannten Therapien sind je-

doch nur unterstützende oder korrigierende Maßnahmen, behandeln das Problem jedoch nicht an der Ursache. Deswegen versuchen viele Forschungsgruppen weltweit dieses Problem der irreversiblen Myokardnekrose mit Hilfe der Stammzelltherapie an der Wurzel fassen zu können und diese neue Therapieform in der Klinik zu etablieren.

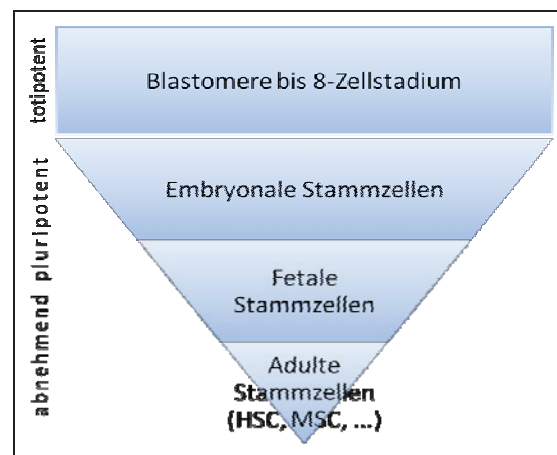
## 1.2. Stammzelltherapie zur Verbesserung der Herzfunktion

Eine Stammzelle ist definitionsgemäß eine undifferenzierte und unbegrenzt teilungsfähige Zelle aus der durch Teilung jeweils wiederum eine Stammzelle und eine zur Differenzierung fähige Zelle entstehen kann<sup>12</sup>.

In der regenerativen Medizin spielen verschiedene Zellpopulationen eine Rolle. Dies sind unter anderem fetale Myozyten<sup>13</sup>, Embryonale Stammzellen (ESC)<sup>14</sup>, skelettale Myoblasten<sup>15,16</sup>, Kardiomyozyten<sup>17,18</sup>, glatte Muskelzellen<sup>19,20</sup>, kardiale, gewebeständige Stammzellen<sup>21</sup>, Stammzellen aus dem Knochenmark<sup>22</sup> und genauer definiert die Hämatopoetischen und Mesenchymalen Stammzellen (MSC)<sup>23</sup>.

Einige dieser Zellen weisen in den Tierexperimenten und klinischen Studien Probleme auf, weswegen ihre Anwendung eingeschränkt ist. Die Embryonalen Stammzellen (ESC) sind stark in ethische Konflikte verstrickt. Man streitet sich, ob die Benutzung der Zellen aus der Blastozyste, ein 4-6 Tage alter Embryo, Tötung ungeborenen Lebens ist oder lediglich die Verwendung eines für den Abfall bestimmten Zellhaufen. Hinzu kommt, das ESC ein tumorigenes Potential besitzen<sup>24</sup>. Dies erschwert und limitiert den Gebrauch von ESC trotz des hohen Differenzierungspotentials massiv. Skelettale Myoblasten verursachten nach Transplantation in klinischen Studien lebensbedrohliche ventrikuläre Tachyarrhythmien<sup>25</sup>, wodurch auch diese Zellen nicht ohne weiteres verwendet werden können.

Obwohl die adulten Stammzellen nicht die Zellen mit der höchsten Potenz sind (**Abb. 1.1**) sind diese am umfangreichsten erforscht. Die Mesenchymalen und CD133-positiven Knochenmarkstammzellen sind Inhalt dieser wissenschaftlichen Arbeit.



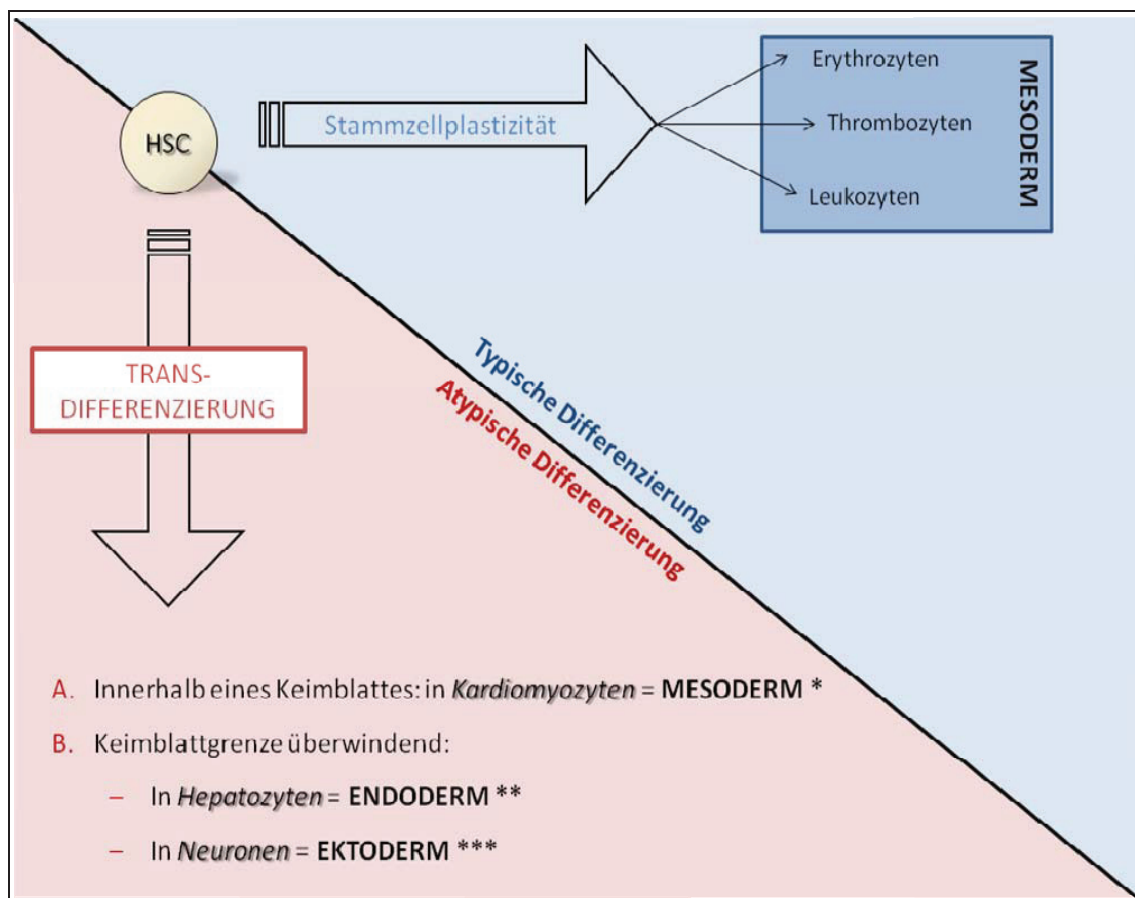
**Abbildung 1.1:** Potenz verschiedener Stammzellen. Modifiziert nach<sup>26</sup>.

Die Mesenchymalen Stammzellen (MSC) sind durch Dr. Friedenstein 1970 zum ersten Mal wissenschaftlich beschrieben worden. Er charakterisierte sie, indem er das komplette Knochenmarkspirat in einer Kulturflasche wachsen lies. Er entfernte die nicht-adhärenenten Zellen und beschrieb die übrig gebliebenen adhärenenten Zellen als „colony-forming fibroblast-like cells“ (CFU-F)<sup>27,28,29</sup>. Heute sind die CFU-F unter einheitlichem Namen in der Forschung bekannt unter anderem auch als „marrow stromal cells“ und Mesenchymale Stammzellen.

Die MSC haben viele Vorteile gegenüber anderen Stammzellen. Sie können aus vielen unterschiedlichen Geweben gewonnen werden. Dazu zählen das Knochenmark<sup>30</sup>, das Fettgewebe<sup>31</sup>, die Plazenta<sup>32</sup>, das Nabelschnurblut<sup>33</sup> und andere. Sie sind leicht zu isolieren und durch ihre Plastikadhärenz auch leicht zu kultivieren. Die MSC besitzen außerdem ein multilineares Potential<sup>34</sup>. Das heißt, dass sie durch relativ einfache Maßnahmen in verschiedenste Gewebe differenzieren können, z.B. in Osteoblasten, Chondrozyten<sup>35</sup>, Neuronen<sup>36</sup>, Skelettmuskelzellen<sup>37</sup> und auch in Kardiomyozyten wie es auch in dieser Arbeit gezeigt wird<sup>38,39,40</sup>. Diese Tatsache prädestiniert die MSC für die Anwendung in der Zelltherapie und zum „Tissue engineering“. Desweiteren haben die MSC eine immunsuppressive Eigenschaft<sup>41,42</sup>, was die Gefahr einer „Graft-versus-Host Reaktion“ nach einer Transplantation deutlich verringert. Ein Nachteil dieser Zellen ist jedoch ihr geringes Vorkommen. Im Knochenmark sind nur 0,001 - 0,01 % der kernhaltigen Zellen MSC, die Hämatopoetischen Stammzellen (HSC) kommen hingegen 10-mal häufiger vor<sup>43,40,44</sup>. Der Anteil im Fettgewebe beträgt 0,1-1 % der Zellen<sup>44</sup>. Dieses geringe Vorkommen kompensieren die Zellen allerdings mit ihrer schnellen *in vitro* Expansionsfähigkeit. Sie können bis auf das 1 Million-fache expandieren, ohne ihr multilineares Differenzierungspotential zu verlieren<sup>34,30,45</sup>. Die MSC sind

demnach für die kardiale Transplantation durchaus geeignet<sup>46,47</sup>. Ein Hindernis ist hingegen noch die geringe Überlebensrate nach der Transplantation und die daraus resultierende geringe funktionale Verbesserung des Herzens<sup>39,48</sup>, was derzeit Thema vieler Forschungsprojekte ist.

Die Hämatopoetischen Stammzellen (HSC), sind nicht-adhärente Zellen, die meistens aus Knochenmark, peripherem Blut oder Nabelschnurblut gewonnen werden. Die am häufigsten gebrauchten Oberflächenmarker sind c-kit/CD117 und sca-1. Die Zellen sind ebenfalls durch die Expression von Oberflächenantigenen wie CD34 und CD45 gekennzeichnet. Im humanen System sind frühe, noch undeterminierte Stammzellen ferner positiv für die Oberflächenantigene CD90 und CD133. CD133 ist ein humanes Homolog des Prominin 5-Transmembranglykoproteins (PROML1). CD133-positive Zellen haben ein hohes hämatopoetisches und angiogenetisches Potential<sup>49,50,51,52</sup>. Eine klinische Studie zeigte, dass sie die kardiale Durchblutung verbessern, nachdem sie während einer Bypass-Operation in ein chronisch infarziertes Myokard gespritzt worden waren<sup>46</sup>. Bis zum Ende des 20. Jahrhunderts war man der Meinung, dass HSC nur ihrem traditionellen Differenzierungsweg folgen können. Diese Auffassung änderte sich, als man herausfand, dass HSC auch einen atypischen Differenzierungsweg einschlagen können<sup>37,53,54</sup>, die sogenannte Transdifferenzierung (**Abb. 1.2**). Da der Oberflächenmarker CD133 zu einem kleinen Teil auch auf Nicht-HSC zu finden ist, werden diese Zellen in dieser wissenschaftlichen Arbeit als CD133-positive Knochenmarkstammzellen bezeichnet (BM-SC).



**Abbildung 1.2:** Differenzierungswege von HSC. Modifiziert nach <sup>26</sup>.

(\* = <sup>55, 106</sup>; \*\* = <sup>56</sup>; \*\*\* = <sup>57</sup>).

Als alternative Erklärung für die Plastizität dieser Zellen wird die Fusion zwischen Stammzellen und Empfängerzelle diskutiert<sup>58,59</sup>.

Der Mechanismus ist noch nicht endgültig geklärt, die Forschungsergebnisse zeigen hingegen schon, dass HSC positive Effekte auf das verletzte Myokard haben. Zu untersuchen bleibt allerdings noch, ob dies durch Transdifferenzierung, Fusion oder parakrine Effekte geschieht, wie z.B. die Sekretion von Chemokinen oder Zytokinen, Stimulation der Regeneration durch Inhibition der Apoptose, Suppression der Immunreaktion, Anregung der Angiogenese oder der Proliferation von gewebeständigen Stamm- und Progenitorzellen<sup>60</sup>.

### 1.3. Zielsetzung

Das Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit ist die eingehende Untersuchung und Charakterisierung des kardiomyozytären Differenzierungspotentials von extrakardialen adulten Stammzellen. Mesenchymale Stammzellen verschiedener Herkunft (BM, CB, PLA) wurden *in vitro* charakterisiert. Ihr Potential zur Differenzierung wurde mittels 5-Azacytidine Behandlung beobachtet. Das kardiomyozytäre Differenzierungspotential der CD133-positiven Knochenmarkstammzellen wurde durch die Ko-Kultivierung mit skelettalen Myoblasten analysiert.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Geräte

Gerät	Typ	Firma
Laminar Luftstrombank	Safeflow 1.2	Nunc
CO <sub>2</sub> -Brutschrank	APT.Line CB	Binder
Wasserbad	W6	Medingen
Große Zentrifuge	Multifuge 1 S-R	Heraeus
Kleine Zentrifuge	Biofuge primo R	Heraeus
Mini Zentrifuge	C1213 und C12XX	VWR international
Cytospin Zentrifuge	A78300002	Thermo SCIENTIFIC
Schüttler	W-150 Waver	VWR international
Vortex	SI-0156	SCIENTIFIC INDUSTRIES, INC
Heizplatte mit Magnetrührer	MR 3001 K	Heidolph
Thermocycler I	PTC-200	MJ Research
Thermocycler II	MJ Mini	BIO RAD
Nano Drop Spectrophotometer	ND-1000	Thermo SCIENTIFIC
Elektrophorese Kammer	Agagel Mini/Maxi	Biometra
Molecular Imager ChemiDoc XRS System (Densitometer)	170-8070	BIO RAD
Mikroskop I	DC 200	Leica
Mikroskop II	DMLB	Leica
Konfokales Laser Rastermikroskop		Leica
FACS Calibur Flow Cytometer (FACS)		BD Bioscience



## 2.2 Software

Software	Name	Firma
Bildbearbeitungssoftware für das Konfokale Laser Rastermikroskop	Leica Confocal Software Lite Version	Leica
Bearbeitungs-, Auswertungssoftware für FACS	Cell Quest Pro	BD Bioscience
Bearbeitungssoftware für Densitometer	Quantity One 4.6.1	BIO RAD
Programm zum Erstellen der Primer	Lasergene®	DNASTAR, Inc.

## 2.3 Standard- und Pufferlösungen

Produktbezeichnung	Katalognummer	Firma
PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$ )	P04-362500	PAN Biotech
PBS-EDTA(2 mM): 500 ml PBS 2 ml 0,5M EDTA	15575-038	GIBCO™
PBS-EDTA (2mM)-BSA (0,5 %): 500 ml PBS 2 ml 0,5M EDTA 2,5 ml Bovine Serum Albumin (BSA)	09300	Stemcell Technologies Inc.
TBE (10x): 162 g Tris	4855.3	ROTH
27,5 g Borsäure	6943.1	ROTH
50 ml 0,5M EDTA 1 l Aqua dest.		

## 2.4 Zellgewinnung

### 2.4.1 Materialien

Produktbeschreibung	Katalognummer	Firma
Indirect CD133 Microbead Kit (human), beinhaltet:	130-091-895	Miltenyi Biotec
- CD133/1 (AC133)-Biotin, human		
- Anti-Biotin Microbeads		
- FcR Blocking Reagent		
RPMI 1640-Medium	E15-840	PAA Laboratories
DNase I	13498000, 10 104 159 001	Roche
MACS® Pre-Separation Filter	130-041-407	Miltenyi Biotec
Zentrifugenröhrchen mit poröser Trennscheibe, Leucosep®, 30ml, sterile	227 290	Greiner Bio-One
Ficoll Paque™ PLUS	17-1440-03	GE Healthcare
Neubauer-Hämozytometer	T728.1	Carl Roth GmbH & Co
MACS-Separatoren:		
OctoMACS (für MS-Säulen)	130-042-109	Miltenyi Biotec
QuadroMACS (für LS-Säulen)	130-090-976	Miltenyi Biotec
MACS-Säulen:		
MS-Säule (für bis zu $2 \times 10^8$ Zellen)	130-042-201	Miltenyi Biotec
LS-Säule (für bis zu $2 \times 10^9$ Zellen)	130-042-401	Miltenyi Biotec
FcR Blocking Reagent	130-059-901	Miltenyi Biotec
Antikörper für die FACS Analyse:		
- CD133/2 (293C3)-PE human	130-090-853	Miltenyi Biotec
- CD45-FITC human	130-080-202	Miltenyi Biotec
- CD34-APC human	130-090-954	Miltenyi Biotec
MSCGM	PT-3001	Lonza
C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -Zelllinie	CRL-1772	ATCC®

### 2.4.2 Zellgewinnung der C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>

C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> ist eine stabile Zelllinie. Es handelt sich hierbei um Myoblasten der Maus, welche käuflich erworben wurden (ATCC®).

### 2.4.3 Zellgewinnung der CD133<sup>+</sup> Stammzellen

Die CD133 positiven (= CD133<sup>+</sup>) Stammzellen wurden aus frischem Knochenmark mit Hilfe eines MACS-Systems gewonnen.

Laut Protokoll wurde das Knochenmark Patienten, die zuvor eingewilligt haben, während einer Sternotomie entnommen und noch im Operationssaal mit 5 ml PBS und 2 mM EDTA versehen, um der Gerinnung des Blutes entgegen zu wirken. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden unter der Laminar Luftstrombank durchgeführt, um ein möglichst hohes Maß an Keimfreiheit zu erzielen. Zum Lösen der Zellen aus dem Knochenmark wurde es im Verhältnis 1:3 mit RPMI 1640-Medium und im Verhältnis 1:200 mit DNase verdünnt. Dieses Gemisch wurde dann 45 min bei RT sanft auf dem Schüttler geschwenkt. Im Anschluss wurde das Gemisch durch einen zuvor gekühlten Nylon Filter von Zellklumpen gereinigt. In der Zwischenzeit wurden 50 ml-Zentrifugenröhrchen, die mit einem festen Filter bei 15 ml versehen sind, mit je 15 ml Ficoll Paque<sup>TM</sup> gefüllt und mit 1000 x g für 5 min zentrifugiert, so dass das Ficoll Paque<sup>TM</sup> unter dem Filter ist. Auf diesen Filter wurden dann je 35 ml des Knochenmark-Gemisches gegeben und erneut bei 1000 x g für 10 min zentrifugiert, wobei ein sehr langsames Rotieren zu Anfang und am Ende sehr wichtig ist, um das zelltoxische Ficoll Paque<sup>TM</sup> nicht mit dem Knochenmark-Gemisch zu vermengen. Danach wurde die oberste Schicht abpipettiert und verworfen, ohne die Interphase mit den mononukleären Zellen, die zwischen Oberphase und Filter gelegen ist, zu zerstören. Die Interphase wurde in einem neuen 50 ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt, mit PBS-EDTA aufgefüllt und bei 20°C und 500 x g für 10 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen, das Pellet mit PBS-EDTA-BSA-Puffer (im folgenden Abschnitt nur noch Puffer genannt) resuspendiert und in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit Puffer aufgefüllt. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurden die so gewonnenen humanen Hämatopoetischen Stammzellen (hHSC) gezählt.

Zur magnetischen Markierung wurden die Zellen erneut mit Puffer gewaschen und zentrifugiert. Dieses Pellet wurde mit 350 µl Puffer /10<sup>8</sup> Zellen resuspendiert. Dann wurde 100 µl FcR Blocking Reagent und 50 µl CD133/1 (AC133)-Biotin/10<sup>8</sup> Zellen hin-

zugegeben und nach gründlichem Vermischen für 10 min bei 4°C inkubiert. Danach wurde das Zentrifugenröhrchen zum Waschen mit Puffer aufgefüllt und bei 500 x g 10 min zentrifugiert, dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Das entstandene Pellet wurde mit 400 µl Puffer / $10^8$  Zellen resuspendiert und 100 µl Anti-Biotin Microbeads / $10^8$  Zellen hinzugegeben. Nach gründlichem Vermischen musste das Zellgemisch für 15 min bei 4°C inkubieren. Danach wurde es erneut gewaschen und bei 500 x g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 2 ml Puffer resuspendiert. Ca. 20.000 Zellen wurden für die spätere FACS Analyse in Puffer-Lösung bei 4°C gelagert.

Zur magnetischen Trennung der Zellen wurde der passende Separator mit der zuvor gekühlten passenden Säule unter der Laminar Luftstrombank aufgebaut. Ein Nylon Filter wurde auf die Säule gesetzt. Zum Anfeuchten wurden 500 µl (bei einer MS-Säule) bzw. 3ml (bei einer LS-Säule) Puffer auf den Filter pipettiert. Dann wurde die Zellsuspension hinzugegeben. Nachdem diese durchgetropft ist, wurde die Säule vier mal mit 500 µl bzw. 3 ml gewaschen, es wurde jedes Mal abgewartet, bis der vollständige Puffer durchgelaufen ist. Nach dem zweiten Waschgang wurde der Filter verworfen. Danach wurde die Säule vorsichtig aus dem Separator genommen und in ein passendes Röhrchen gestellt. Zum Auswaschen der Zellen wurden 2 x 1 ml bzw. 2 x 5 ml Puffer auf die Säule pipettiert und jeweils mit dem passenden Stempel durchspült.

Um die Reinheit der CD133<sup>+</sup> Zellen zu erhöhen werden die Schritte der magnetischen Trennung wiederholt, hierbei wird immer eine MS-Säule verwendet.

Zum Schluss wurde erneut eine Zellzählung durchgeführt. Die Anzahl der CD133<sup>+</sup> Zellen ist ca. 1/1000 der zuvor gezählten hHSC.

Es wurden wiederholt ca. 10.000 Zellen für die FACS Analyse in Puffer-Lösung bei 4°C gelagert.

#### 2.4.4 Analyse der Reinheit der CD133<sup>+</sup> Zellen

Um die Reinheit dieser Stammzellen zu untersuchen, wurde eine FACS Analyse durchgeführt.

Hierzu wurden die zuvor bei 4°C in Pufferlösung gelagerten Zellen benutzt. Die Zellen „vor der Separation“ wurden auf zwei 1,5ml Röhrchen (Röhrchen I und II) aufgeteilt, die nach der Trennung in ein drittes 15ml Röhrchen (Röhrchen III) gegeben wurde. Alle wurden bei RT und 1000 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Röhrchen I wurde mit 50 µl Puffer resuspendiert, Röhrchen II und III mit 35 µl. In alle wurden 10 µl FcR Blocking Reagent pipettiert. In Röhrchen II und III wurden zusätzlich je 5µl der drei folgenden Antikörper gegeben:

- CD133/2 (293C3)-PE human
- CD45-FITC human
- CD34-APC human

Anschließend wurden alle drei Röhrchen bei 4°C für 10 min inkubiert. Danach wurden sie je dreimal gewaschen, indem je 1 ml Puffer hinzugegeben wurde und dann bei RT und 1000 x g für 5 min zentrifugiert wurde. Zum Schluss wurde das Pellet in 300 µl Puffer resuspendiert und in ein spezielles FACS-Röhrchen pipettiert, so dass es mit dem Durchflusszytometer analysiert werden konnte.

#### 2.4.5 Zellgewinnung der hMSC

Die Isolierung der humanen Mesenchymalen Stammzellen (hMSC) aus dem Knochenmark war ähnlich durchzuführen wie die der CD133<sup>+</sup> Zellen. Nach der Trennung der Zellen mit Ficoll Paque<sup>TM</sup> wurde die Interphase mit den mononukleären Zellen in einer Konzentration von 100 Mio. Zellen/7ml speziellem Wachstumsmedium (MSCGM)/75cm<sup>3</sup>-Gewebekulturflasche überführt. In den folgenden Tagen blieb die Population der hMSC durch ihre Oberflächenadhärenz an den Plastikflaschen haften. Die nicht-adhärenenten Knochenmarkzellen wurden durch mehrere Waschschriffe effektiv herausgespült.

Die hMSC aus Fettgewebe (PLA = engl.: processed liposuction aspiration, Fettabsaugung) und aus Nabelschnurblut (CB = engl.: cord blood) isolierte die Arbeitsgruppe von Dr. rer. nat. Karen Bieback aus dem Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie in Mannheim zugehörig der Universität Heidelberg und übergab es zur weiteren Kultivierung und Charakterisierung im Rahmen des „START-MSC“ Projektes.

## 2.5 Zellkultivierung

### 2.5.1 Materialien

Produktbezeichnung	Katalognr.	Firma
Angereichertes DMEM (7% FBS, 1% P/S, 0,1% Amph. B):		
- 500ml DMEM	P04-03550	PAN Biotech
- 35ml Fetal Bovine Serum (FBS)	P30-3300	PAN Biotech
- 5ml Penicillin/Streptomycin (P/S)	P11-010	PAA Laboratories
- 500µl Amphotericin B (Amph. B)	P11-001	PAA Laboratories
Trypsin-EDTA in PBS (1x)	L11-003	PAA Laboratories
Einfriermedium:		
95 % FBS	P30-3300	PAN Biotech
5 % DMSO	276855-100ml	SIGMA-Aldrich
Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM)	PT-3001	Lonza
5-Azacytidine	A2385	Sigma-Aldrich

### 2.5.2 Zellkultivierung

#### 2.5.2.1 Kultivierung der Zelllinie C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>

Die Zelllinie C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> ist morphologisch den Fibroblasten sehr ähnlich. Sie kommt aus dem Muskelgewebe der Maus und eignet sich sehr gut für in vitro Studien.

Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in angereichertem DMEM (7% FBS, 1% P/S, 0,1% Amph. B) gehalten, welches alle zwei bis drei Tage gewechselt wurde. Bei einer Konfluenz von ca. 70% wurden die Zellen passagiert, da sie bei zu hoher Dichte differenzieren würden.

Zum Passagieren wurde das alte Medium entfernt und zweimal mit PBS gespült. Dann wurde soviel Trypsin hinzugegeben, dass die Zellen eben bedeckt waren. Nach 5 min im CO<sub>2</sub>-Brutschrank waren die Zellen von der Zellkulturflasche gelöst. Durch Hinzugabe von frischem Medium wurde das Trypsin inaktiviert. Das Zell-Trypsin-Medium-Gemisch wurde in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 22°C und 300 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden dann auf drei frische Zellkulturflaschen verteilt, mit ausreichend Medium versehen und zurück in den Brutschrank gebracht.

Zum Einfrieren der Zellen wurde das Pellet mit einem speziellen Einfriermedium resuspendiert, welches proteinreicher ist und die Zellen somit besser versorgt. In passende Kryo-Röhrchen gegeben, wurde es bei -80 bis -196°C (Flüssigstickstoff) gelagert.

#### 2.5.2.2 Kultivierung der Ko-Kultur

Die Ko-Kultur mit C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> und CD133<sup>+</sup> Stammzellen wurde ähnlich behandelt wie die Reinkultur von C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>.

Direkt nach der Isolierung der Stammzellen wurden diese in einem bestimmten Verhältnis mit den Maus-Myoblasten C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> ko-kultiviert. Nach einigen Testläufen stellte sich heraus, dass das Verhältnis 1:4 (CD133<sup>+</sup> : C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>) die besten Ergebnisse bringt. Erst nach fünf bis sechs Tagen wurde das Medium zum ersten Mal gewechselt, um den Stammzellen, die von Natur aus keine Fähigkeit zur Adhärenz besitzen, die Möglichkeit zu geben, sich von den Myoblasten verändern zu lassen und ebenfalls zu adhären. Danach wurde die Ko-Kultur jedoch genauso behandelt wie die Reinkultur.

#### 2.5.2.3 Kultivierung der hMSC

Die humanen Mesenchymalen Stammzellen waren schwieriger zu kultivieren. Sie haben eine zartere Morphologie und wachsen viel langsamer.

Als Medium wurde das MSCGM verwendet, welches alle zwei bis drei Tage gewechselt wurde, sie wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank gehalten. Bei einer Dichte von ca. 70% wurden auch diese Zellen in der gleichen Weise passagiert wie die Zelllinie C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, da auch diese Stammzellen eine andere Morphologie annehmen, wenn sie zu dicht wachsen.

#### 2.5.2.4 Differenzierung der hMSC mit 5-Azacytidine

Um die hMSC zur Differenzierung zu kardialen Zellen anzuregen wurden sie mit 5-Azacytidine behandelt.

Die zuvor wie beschrieben isolierten humanen Mesenchymalen Stammzellen wurden ca. eine Woche kultiviert. Dann wurde das Medium (MSCGM) 1:1000 mit 5-Azacytidine angereichert und für 24 Std. inkubiert. Anschließend wurde das Medium gegen frisches, unbehandeltes MSCGM ausgewechselt. Nach zwei und drei Wochen waren die Zellen bereit zur Auswertung mittels Immunofärbung, RT-PCR und FACS.

## 2.6 Immunofärbung

### 2.6.1 Materialien

Produktbeschreibung	Katalognr.	Firma
Zellkultur 24-Well Platte	662160	Greiner Bio One
13 mm ø Deckgläschen	163-9161065	Menzel
Triton X-100 (0,2%) mit PBS	T9284-500ml	SIGMA-Aldrich
Paraformaldehyd (PFA)-Lösung (4%):		
- 2g PFA	P6148-500G	SIGMA-Aldrich
- 45ml Aqua dest.		
- Tropfen 5N NaOH		
- 5ml PBS		
Protein Block	X0909	Dakocytomation
Antikörper Verdünnungspuffer	S3022	Dakocytomation
<u>Primärantikörper:</u>		
1. Intrazelluläre Marker:		
- MEF-2 (C-21):	Sc-313	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
- Troponin I (H-170)	Sc-9053	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
- Nkx-2.5 (N-114)	Sc-14033	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
- Mouse Anti-Human Mitochondria Monoclonal Antibody (mo anti-human mito)	MAB1273	Chemicon
- Mouse Anti-Human Nuclei Monoclonal Antibody (mo anti-human nuclei)	MAB1281	Chemicon
2. Oberflächenmarker:		
- CD44-PE	ab19618-100	Abcam
- CD45-FITC	130-080-202	Miltenyi Biotec
- CD34-PE	130-090-945	Miltenyi Biotec
<u>Sekundärantikörper:</u>		
- Alexa Fluor 488nm anti rabbit	A21206	Invitrogen
- Alexa Fluor 568nm anti mouse	A11019	Invitrogen
<u>Kernfärbung:</u>		
- DRAQ5	DR50050	Biostatus Limited
Fluorsave™ Reagent (FSR)	345789	Calbiochem



### 2.6.2 Vorbereitung der Zellen

Die zur Immunfärbung vorgesehenen Zellen wurden einen Tag zuvor passagiert. Unter Berücksichtigung des Wachstums über Nacht und des Wissens über die ungefähre Anzahl der Zellen, die für ein 24-Well optimal sind (ca.  $2 \times 10^5$  Zellen), wurden die Zellen auf eine 24-Well Platte, mit sterilen Deckgläschen bestückt, gegeben. Pro zu untersuchendes Antigen wurde ein Deckgläschen verwendet.

Zur Immunofärbung von nicht-adhärenenten Zellen, wie die CD133<sup>+</sup> Stammzellen, wurden diese zuvor mit einer Cytospin-Zentrifuge auf einen Objektträger zentrifugiert und luftangetrocknet. Anschließend wurde nach dem Protokoll der adhärenenten Zellen gearbeitet.

### 2.6.3 Färbung

Zur Durchführung der Immunfärbung wird das alte Medium aus den Vertiefungen der Well-Platte genommen.

Um den Lebensvorgang der Zellen zu stoppen und weitere strukturelle Veränderungen zu verhindern und um die Zellen für die folgende Färbung zu stabilisieren, wurden sie mit einer 4 % -Paraformaldehyd (PFA)-Lösung fixiert.

Das PFA wurde hergestellt, indem 40 ml Aqua dest. und 2 g PFA-Pulver auf einer Heizplatte erhitzt und mit einem Magnetrührer vermengt wurden, nach ca. 10 min wurden 2 Tropfen NaOH hinzugegeben, um den pH-Wert zu optimieren. Im Weiteren wurden 5 ml PBS dazu gegeben und gerührt, bis die Lösung klar wurde. Zum Ende wurde die Menge bis 50 ml mit Aqua dest. aufgefüllt und auf kleine 2 ml-Röhrchen aufgeteilt. Diese wurden eingefroren, so dass zu jeder Immunofärbung frisches PFA verwendet werden konnte.

500 µl PFA pro Vertiefung mussten 10 min bei 37°C inkubieren und wurden anschließend verworfen.

Im Folgenden wurden 500 µl des Detergenz Triton X-100 für 10 min auf jene Zellen gegeben, die später mit einem Antikörper gefärbt werden sollten, welcher ein intrazelluläres Antigen markieren sollte. Die Antikörper könnten ohne dieses Detergenz die Zellmembran nicht durchdringen. Triton X-100 macht die Membranen jedoch durchlässig, so dass die Antikörper ihr Zielantigen erreichen können.

Das Triton X-100 wurde verworfen und die Vertiefungen mit den Deckgläschen einmal mit PBS für 10 min gewaschen.

Anschließend wurden die Deckgläschen vorsichtig aus den Vertiefungen der Wellplatte genommen und mit der Zellseite nach unten auf eine saubere, nicht sterile Unterlage mit je einem Tropfen (ca. 100 µl) Proteinblockierungsreagenz gelegt. Nach einer 30 minütigen Inkubationszeit bei RT wurden die Deckgläschen wiederum mit der Zellseite nach unten auf je 100 µl des Primärantikörpers gelegt. Parallel zu dem zu untersuchenden Antigen wurde auf jedes Deckgläschen ein Antikörper gegeben, der die menschliche Abstammung der Zelle beweisen sollte. Dazu wurde entweder ein Antikörper gegen menschliche Zellkerne oder die Mitochondrien hinzugegeben. Bei den Primärantikörpern wurden folgende Konzentrationen verwendet:

Tab.2.1 Primärantikörper und deren Verdünnung

Antikörper	Konzentration, verdünnt in Verdünnungspuffer
MEF-2	1:50
Troponin I	1:50
Nkx-2.5	1:50
Mo anti-human mito	1:30
Mo anti-human nuclei	1:20
CD44-PE	1:50
CD45-FITC	1:10
CD34-PE	1:10

Als Negativkontrolle wurde auf je ein Deckgläschen kein Primärantikörper gegeben, anstatt dessen wurden 100 µl PBS verwendet.

Die Primärantikörper inkubierten über Nacht bei 4°C in einer Box mit hoher Luftfeuchtigkeit, so dass der Primärantikörper nicht verdunstet. Hierzu wurde eine Box verwendet, die am Boden mit Wasser gefüllt war. Die Deckgläschen lagen auf einem Gitter auf einem „Parafilm“ Streifen. Die Box war lichtundurchlässig verschlossen.

Am folgenden Tag wurden die Deckgläschen gewaschen, indem sie mit der Zellseite nach unten für 10 min auf einen 100 µl-Tropfen PBS gelegt worden sind. Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt.

Anschließend wurde der Sekundärantikörper aufgetragen. Hierbei wurden die zwei Sekundärantikörper gegen das zu untersuchende Antigen und das menschliche Antigen in einem Röhrchen vermischt. Folgende Verdünnungen wurden verwendet:

Tab.2.2 Sekundärantikörper und deren Verdünnung

Antikörper	Konzentration, verdünnt in Verdünnungspuffer
Alexa Fluor 488nm anti rabbit	1:1000
Alexa Fluor 568nm anti mouse	1:1000

Bei Primärantikörpern, welche bereits konjugiert sind, ist kein Sekundärantikörper nötig.

Der Sekundärantikörper musste für eine Stunde bei RT in der Box feucht und dunkel inkubieren.

Anschließend wurden die Zellen wie zuvor drei- bis viermal gewaschen. Dann wurden die Kerne mit DRAQ5 angefärbt. Dies ist ein unspezifischer DNA-Fluoreszenzmarker im Infrarotbereich (633nm). Er inkubierte in einer Verdünnung von 1:100 für 20 min. Zwei weitere Waschdurchgänge folgten.

Zum Abschluss wurden Objektträger präpariert. Sie wurden gereinigt, es wurden 10 µl des Einbettmediums „FSR“ hinauf pipettiert und zügig das Deckgläschen mit der Zellseite nach unten so aufgelegt, dass keine Blasen darunter entstanden sind. Die Zellen sind nun fertig zur Auswertung unter dem Mikroskop.

#### **2.6.4 Auswertung der Zellen**

Die Zellen wurden mit dem Konfokalen Laser Rastermikroskop ausgewertet. Hierzu wurden drei Laser verwendet, so dass alle drei Wellenlängen gleichzeitig darzustellen waren:

- 488 nm
- 568 nm
- 633 nm.

Das Konfokale Laser Rastermikroskop bietet im Gegensatz zum konventionellen Lichtmikroskop oder Epifluoreszenzmikroskop den Vorteil, dass zweidimensionale Schnittbilder erstellt werden können, welche später sogar zu einem dreidimensionalen Bild rekonstruiert werden können. Dies ist vergleichbar mit einem CT (Computertomographie)-Bild in der Medizin. Es können somit intrazelluläre Strukturen optisch höher aufgelöst dargestellt werden.

Als Negativkontrolle wurde die Reinkultur der Zelllinie C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> verwendet, die in gleicher Weise gefärbt und ausgewertet wurde.

## 2.7 RNA-Isolierung und RT-PCR

### 2.7.1. Materialien

Produktbeschreibung	Katalognr.	Firma
RNeasy® Mini Kit, beinhaltet: <ul style="list-style-type: none"> <li>- RLT-Puffer</li> <li>- RW1 Puffer</li> <li>- RPE Puffer</li> <li>- RNeasy Mini Spin Säule im 2ml-Röhrchen</li> <li>- RNase freies Wasser</li> </ul>	74106	Qiagen
RNeasy® Micro Kit, beinhaltet: <ul style="list-style-type: none"> <li>- RLT-Puffer</li> <li>- RW1 Puffer</li> <li>- RDD Puffer</li> <li>- DNase I</li> <li>- RPE Puffer</li> <li>- RNeasy MinElute Spin Säule im 2ml-Röhrchen</li> <li>- RNase freies Wasser</li> </ul>	74004	Qiagen
DEPC-treated Water = Nuklease freies Wasser	9906	Ambion
10mm dNTP-Mix	U1511	Promega
Oligo (dT) <sub>15</sub> Primer	C1101	Promega
RNasin® RNase Inhibitor	N2511	Promega
RNase H	M4281	Promega
Superscript™ III Reverse Transcriptase, beinhaltet: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Superscript™ III RT (200U/μl)</li> <li>- 5x First-Strand Buffer</li> <li>- 0,1 M DTT</li> </ul>	18080-093	Invitrogen
GoTaq® Green Master Mix, beinhaltet: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Reaktionspuffer (pH 8,5)</li> <li>- 400 μm dATP</li> <li>- 400 μm dGTP</li> <li>- 400 μm dCTP</li> <li>- 400 μm dTTP</li> <li>- 3 mm MgCl<sub>2</sub></li> <li>- Probenpuffer mit Farbmarker</li> </ul>	M7113	Promega

### 2.7.2. RNA-Isolierung

Zur Untersuchung der Zellen auf molekularer Ebene musste zuerst die RNA der Zellen isoliert werden, um sie anschließend vervielfältigen und auswerten zu können.

Die Isolierung erfolgte laut Protokoll des RNeasy® Mini bzw. Micro Kit. Dies war abhängig von der zur Verfügung stehenden Ausgangsmenge an Zellen. Das Micro Kit verwendete man für bis zu 45 µg RNA und das Mini Kit für bis zu 100 µg RNA.

Zur Isolierung mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits wurden ca.  $1 \times 10^6$  Zellen verwendet. Laut Protokoll wurde das Zellpellet mit 350 µl eines Guanidiniumisothiocyanat-Lysispuffer (RLT-Puffer) resuspendiert. Dann wurde die gleiche Menge an 70%-Ethanol hinzugegeben, um das Lysat zu homogenisieren und die Bindungseigenschaften der RNA an die Säulenmembran zu ordnen. Diese 700 µl wurden dann auf die mitgelieferte RNeasy Mini Spin Säule, die mit einer Membran ausgestattet ist, pipettiert und für 15 sek bei 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, die RNA wurde von der Membran adsorbiert. Zum Waschen wurden zuerst 700 µl des RW1 Puffers in die Säule pipettiert und bei 8000 x g für 15 sek zentrifugiert. Im Weiteren wurde die Säule in ein neues Röhrchen gestellt, 500 µl des zweiten Waschpuffers, RPE, hinzugegeben und erneut mit 8000 x g 15 sek zentrifugiert. Daraufhin wurden wieder 500 µl des RPE-Puffers auf die Säule gegeben und nun bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. In ein neues Röhrchen gestellt wurde ein zweiter Trocknungsvorgang bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min durchgeführt, daraufhin wurde die Säule in ein neues 1,5 ml-Röhrchen gestellt und 40 µl RNase freies Wasser direkt auf die Membran pipettiert. Zum Auswaschen der RNA aus der Membran wurde das Röhrchen nun bei 8000 x g für 1 min zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt, der Durchfluss erneut auf die Membran pipettiert und zentrifugiert. Der Durchfluss war die isolierte RNA.

Zur Isolierung der RNA mit Hilfe des RNeasy® Micro Kits wurde zu Anfang wie bei dem Mini Kit verfahren. Die Zellen wurden lysiert, homogenisiert und anschließend ebenfalls auf die mitgelieferte RNeasy MinElute Spin Säule pipettiert. Bei 8000 x g wurde diese 15 sek zentrifugiert und der Durchfluss anschließend verworfen. Inzwischen wurden 10 µl der DNase I mit 70 µl des mitgelieferten RDD Puffers vorsichtig vermengt, da DNase sehr empfindlich ist, und anschließend direkt auf die Kieselerdegel-Membran pipettiert und für 15 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden 350 µl des RW1 Wasch-Puffers auf die Membran gegeben und bei 8000 x g 15 sek zentrifugiert. Die Säule in ein neues Röhrchen gesetzt wurden dann 500 µl des RPE Wasch-Puffers dazu gegeben und erneut bei 8000 x g für 15 sek zentrifugiert, der Durchfluss wurde

verworfen. Daraufhin wurden 500 µl 80%-Ethanol in die Säule gegeben und bei 8000 x g für 2 min zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Dann wurde die Säule wieder in ein neues 2 ml-Röhrchen gesetzt und mit offenem Deckel bei maximaler Geschwindigkeit 5 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Säule in ein 1,5 ml-Röhrchen gesetzt. Zum Auswaschen der RNA wurde nun 16 µl RNase freies Wasser auf die Mitte der Membran pipettiert und bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min zentrifugiert. Der Inhalt des Röhrchens entspricht der RNA.

Zum Zweck der Negativkontrolle wurde ebenfalls die RNA der C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen isoliert. Als Positivkontrolle wurde die cDNA aus menschlichem Herzgewebe gewonnen, welche während einer Operation am offenen Herzen (an der Universität zu Rostock, Abteilung Chirurgie) vom linken Herzohr entnommen worden ist.

### **2.7.3. Quantifizierung der RNA**

Der Ertrag der RNA wurde mit Hilfe eines Nano Drop Spectrophotometers gemessen. Hierbei benötigt man lediglich 1 µl der RNA, um den Ertrag in ng/µl zu erhalten. Diese Werte wurden im nächsten Schritt, der Reversen Transkription, zum Berechnen der Protokolle benötigt.

### **2.7.4. Reverse Transkription**

Die Reverse Transkription ist der erste Schritt der RT-PCR. Die zuvor gewonnene RNA wird in eine komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt, da die anschließende PCR nur in der Lage ist DNA zu amplifizieren.

Das hierbei arbeitende Enzym ist die Reverse Transkriptase oder RNA-abhängige DNA-Polymerase, dies sind in der heutigen Molekulargenetik veränderte Enzymvariante aus unterschiedlichen Retroviren. Das Enzym wurde erstmals 1970 beschrieben. Es arbeitet entgegen der eigentlichen Richtung der Transkription, deswegen „revers“, bei der aus einer DNA eine mRNA erstellt wird. Die Reverse Transkriptase macht aus einer einsträngigen RNA eine komplementäre, doppelsträngige DNA. Dazu synthetisiert sie zuerst einen RNA-DNA-Hybridstrang, um anschließend die RNA Anteile mit einer RNase H abzubauen. Zum Schluss wird mit einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase der Doppelstrang vervollständigt.

In meinen Versuchsreihen wurde das Enzym Superscript™ III Reverse Transkriptase verwendet, eine Enzymvariante die aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus (M-MLV) isoliert worden ist. Zum Starten der cDNA-Synthese benötigt man Primer, hier wurden die Oligo (dT) Primer<sub>15</sub> verwendet. Diese starten am 3'-Ende der RNA, wo sich der Poly-A-Schwanz befindet, die Transkription. Zum Auffüllen des Hybridstranges benötigt man dNTP.

Um nun den identischen RNA Gehalt in den zu untersuchenden Proben zu haben, wird die Menge an RNA in µg anhand des geringsten Gehaltes festgelegt. Es werden jeweils 2 µl dNTP und 2 µl Oligo (dT) Primer zu jeder Probe gegeben und mit Nuklease freiem Wasser auf ein Endvolumen von 26 µl aufgefüllt. Dieses Gemisch wird nun in einem Thermocycler für 5 min auf 65°C erhitzt und anschließend für 10 min auf 4°C herunter gekühlt. Währenddessen wurde der cDNA-Synthese Mix vorbereitet.

Tab. 2.3 cDNA-Synthese Mix pro Röhrchen

5x First Strand Buffer	8 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNase Inhibitor	2 µl
Superscript™ III RT (200U/µl)	2 µl

Diese 14 µl cDNA-Synthese Mix wurden anschließend zu dem RNA-Primer Gemisch gegeben und vorsichtig vermischt. Dann wurde in dem Thermocycler für 50 min bei 50°C die Reverse Transkription durchgeführt, eine anschließende Phase von 5 min bei 70°C beendet die Aktion. Dann wurden 2 µl RNase H hinzugegeben und bei 37°C für 20 min inkubiert um die RNA Matrize abzubauen. Das Endprodukt ist eine cDNA-Matrize, welche nun mittels PCR vervielfältigt werden kann.

#### 2.7.5. Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die PCR ist ein molekulargenetisches *in vitro* Verfahren, bei dem selektiv bestimmte DNA-Abschnitte amplifiziert werden können. Es wurde 1985 von R.V. Saiki und seinen Mitarbeitern entwickelt<sup>61</sup>. Zu Beginn wird die doppelsträngige DNA denaturiert, dies geschieht, indem bei 95°C die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen werden. Die Sequenz von Interesse wird von zwei synthetischen Oligonukleotiden, die so genannten Primer, flankiert, die komplementär zu den Enden der Ziel-DNA-Sequenz sind. Sie legen den Startpunkt fest. Dies wird Primer-Hybridisierung oder Primer-Annealing genannt. Die Annealing-Temperatur ist individuell für jeden Primer und hängt von der Sequenz, bzw. ihrem Gehalt an GC- und AT-Basen ab. Sie sollte experi-

mentell ermittelt werden. Daraufhin folgt die Elongation mittels einer Taq-DNA-Polymerase. Sie wurde aus einem thermophilen Bakterium, dem *Thermus aquaticus*, gewonnen, so dass ihr Temperaturoptimum bei 72°C liegt. Mit Hilfe von  $Mg^{2+}$ -Ionen und Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP) als Bausteine wird der DNA-Einzelstrang dann in 3'-5' Richtung aufgefüllt. Somit kann die DNA innerhalb weniger Zyklen, ca. 40, exponentiell angereichert werden, so dass sie später mittels Agarose Gel Elektrophorese nachgewiesen werden kann.

Die PCR wurde mit Hilfe eines PCR-Master Mix (GoTaq® Green) durchgeführt, indem bereits dNTP,  $Mg^{2+}$ -Ionen, Reaktionspuffer und der für die Agarose Gel Elektrophorese benötigte Probenpuffer enthalten ist.

Für die PCR-Reaktion der verschiedenen Experimente wurden folgende Primer Sequenzen verwendet:

Tab. 2.4 DNA-Primer Sequenzen, deren Basenpaar-Länge und Annealing-Temperatur ( $T_m$ )

Gen	Sequenz	Länge (bp)	$T_m$ (°C)
GAPDH	Sense: 5'-CCA TCA CCA TCT TCC AGG AG-3' Antisense: 5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG-3'	343	56
hGAPDH <sup>62</sup>	Sense: 5'-CTG ATG CCC CCA TGT TCG TC-3' Antisense: 5'-CAC CCT GTT GCT GTA GCC AAA TTC G-3'	596	56
mrGAPDH	Sense: 5'-TGA AGG TCG GTG TCA ACG GAT TTG GC-3' Antisense: 5'-CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3'	950	56
<b>„Differenzierungs-Marker“:</b>			
hNkx2.5	Sense: 5'-CTT CTC AGT CAA AGA CAT CCT-3' Antisense: 5'-TCC AGC TCC ACC GCC TTC-3'	224	60
hTn-T <sub>2</sub>	Sense: 5'-GAT TCT GGC TGA GAG GAG GA-3' Antisense: 5'-TGG AGA CTT TCT GGT TAT CGT TG-3'	213	62,6
<b>„Stemness-Marker“:</b>			
Oct-4	Sense: 5'-CGT GCA GGC CCG AAA GAG AAA-3' Antisense: 5'-TGG GGC CAG AGG AAA GGA CAC T-3'	271	60
Rex-1	Sense: 5'-AGA GAC ATT TCC TGG TTC ATA CTG-3' Antisense: 5'-CTA CTT TCC CTC TTG TTC ATT CTT-3'	236	53,8
Wnt-3	Sense: 5'-CGG GCC GCA CGA CTA TCC TG-3' Antisense: 5'-CTT CCG CTT CTC CGT CCT CGT GT-3'	404	62
Nanog	Sense: 5'-CCG AAG AAT AGC AAT GGT GTG AC-3' Antisense: 5'-AGG AGA ATT TGG CTG GAA CTG C-3'	303	57,5

Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als sog. Haushaltsgen (engl.: house-keeping gene) verwendet. Es ist ein Enzym der Glykolyse und somit in jeder Zelle vorhanden. Es dient als Abgleich der verwendeten DNA-Mengen. hGAPDH bzw. mrGAPDH weisen spezifisch menschliche bzw. Zellen von Ratten und Mäusen nach.



Das Reaktionsgemisch wurde wie folgt zusammengestellt:

Tab. 2.5 PCR-Master Mix für ein 50µl Reaktionsvolumen

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
GoTaq® Green Master Mix	25 µl	1x
Oberer Primer, 10µm	2,5 µl	0,5 µm
Unterer Primer, 10µm	2,5 µl	0,5 µm
cDNA-Matrize	1 µl	<250 ng
Nuklease-freies Wasser	19 µl	N/A

Dieser PCR-Master Mix wurde für jeden der verwendeten Primer hergestellt und in spezielle 200µl-Reaktionsgefäße gefüllt.

Als Negativkontrollen bei den Ko-Kulturen dienten die Reinkulturen der Partner, CD133<sup>+</sup> Stammzellen und C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen.

Als Negativkontrolle bei der Behandlung von hMSC dienten die unbehandelten hMSC.

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde nach folgendem Profil durchgeführt:

Tab. 2.6 Einstellung des Thermocyclers zur PCR

I.	Initiale Denaturierung	95°C	2min
II.	Denaturierung	95°C	1min
III.	Primer-Hybridisierung	Primer-spezifisch, siehe Tab. 2.4	30sek
IV.	Extension	72°C	1min
V.	Wiederholung	Zyklus II-IV, 34x	
VI.	Elongation	72°C	15min
VII.	Lagerung	4°C	dauerhaft
VIII.	Ende		

## 2.8. Agarose Gel Elektrophorese

### 2.8.1. Materialien

Produktbeschreibung	Katalognummer	Firma
Biozym LE Agarose	840004	Biozym
Ethidium Bromid (EB) Lösung	E1510	SIGMA-Aldrich
100 bp DNA Leiter mit Probenpuffer (im Verhältnis 1:6 gemischt)	15628-050 X9101	Invitrogen Carl Roth GmbH & Co

### 2.8.2. Herstellung und Vorbereitung des Agarose Gels

Für die Herstellung eines 1,8 % igen Agarose Gels wurden LE Agarose Pulver und TBE-Puffer verwendet. Die Agaroselösung wurde aufgeköcht, bis die Agarose gelöst war. Anschließend wurden 4 µl EB-Lösung pro 100 ml Gellösung hinzugegeben und vermengt. Diese Flüssigkeit wurde dann in die Gel-Kammer gegossen und der Kamm auf einer Seite hineingesteckt. Das Gel trocknete 20 min. Anschließend wurde der Kamm entfernt und die Gel-Kammer in den TBE-Laufpuffer gelegt, so dass es vollständig mit Puffer bedeckt war. Die Geltaschen zeigten zur negativen Elektrode der Kammer.

### 2.8.3. Durchführung der Elektrophorese

Die erste Kammer des Agarose Gels wurde mit 3 µl der DNA Leiter versehen, die restlichen mit den zu testenden DNA-Proben, wobei von den GAPDH-Proben jeweils 5 µl verwendet worden sind, von den mrGAPDH jeweils 6 µl und von den restlichen Proben 10 µl.

Die Elektrophorese-Kammer wurde an eine Gleichstromspannung von 120 Volt für 1 Std angeschlossen. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht ausgewertet.

## 2.9. Analyse der Zelloberfläche der hMSC mittels FACS

### 2.9.1. Materialien

Produktbeschreibung	Katalognummer	Firma
FcR Blocking Reagent	130-059-901	Miltenyi Biotec
Primäre Antikörper, konjugiert:		
- CD45-FITC	130-080-202	Miltenyi Biotec
- CD34-PE	130-090-945	Miltenyi Biotec
- CD44-PE	ab19618	abcam
- CD105-FITC	ab18278	abcam
- CD90-PE	555596	BD Biosciences
Primäre Antikörper, unkonjugiert:		
- CD29 (anti hamster)	550530	BD Biosciences
- CD73 (anti mouse)	550256	BD Biosciences
Sekundäre Antikörper:		
- Alexa Fluor 488nm anti-hamster	A-21110	Invitrogen
- Alexa Fluor 488nm anti-mouse	A-11017	Invitrogen

### 2.9.2. Vorbereitung der Zellen

Zur Analyse der Zelloberfläche mittels FACS wurden die Zellen zuerst wie gewohnt trypsinisiert und gezählt. Dann wurden ca. 10.000 bis 20.000 Zellen pro zu untersuchende Probe verwendet.

Als Negativkontrolle wurden zum einen Zellen ohne Antikörper versetzt verwendet und zum anderen Zellen, die nur mit dem zweiten Antikörper versetzt worden sind.

Die Zellen wurden bei 1000 x g, 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml PBS-EDTA-BSA resuspendiert und erneut zentrifugiert, dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt, wobei immer darauf zu achten war, das Pellet nicht zu berühren. Daraufhin wurden die primären Antikörper in folgender Konzentration hinzugegeben:

Tab. 2.7 Primäre Antikörper zur FACS-Analyse und deren Konzentration

Primärer Antikörper	Konzentration
CD45-FITC	1:10
CD34-PE	1:10
CD44-PE	1:10
CD105-FITC	1:5
CD90-FITC	1:10
CD29	1:10
CD73	1:10

Zusätzlich wurde das Blocking Reagent in einer Konzentration von 1:5 hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch musste bei 4°C 30 min inkubieren. Anschließend wurde wie zu Anfang zweimal gewaschen.

Die Proben mit den konjugierten Antikörpern und die Negativkontrolle ohne Antikörper wurden nach Resuspension in 300 µl PBS-EDTA-BSA in ein spezielles FACS-Röhrchen gegeben.

Den Proben mit den unkonjugierten Antikörpern und der zweiten Negativkontrolle wurde der komplementäre sekundäre Antikörper in einer Konzentration von 1:1000 beigelegt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT und einem dreimaligen Waschvorgang wurden auch diese Proben in FACS-Röhrchen gegeben und ausgewertet.

### 2.9.3. Durchführung der FACS Analyse

Die FACS Analyse wurde mit Hilfe eines Durchflusszytometers durchgeführt.

### 2.9.4. Auswertung der FACS Analyse

Die Auswertung erfolgt mit Hilfe von Punkt- und Flächendiagrammen. Mit Hilfe von Subtraktion der jeweiligen Negativkontrollen von den zu untersuchenden Proben konnten die Häufigkeiten der jeweiligen Oberflächenmarker analysiert werden.

## 2.10. Analyse der Wachstumsgeschwindigkeit der hMSC mittels FACS

### 2.10.1. Materialien

Produktbeschreibung	Katalognummer	Firma
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit, enthält: <ul style="list-style-type: none"><li>- Diluent C</li><li>- PKH26-Färbemittel</li></ul>	MINI26	SIGMA-Aldrich

### 2.10.2. Vorbereitung der Zellen

Sowohl die *in vivo* Situation im Knochenmark als auch die Situation im Herzinfarktgebiet ist hypoxisch.

Zur Untersuchung der Proliferationsgeschwindigkeit von hMSC aus den drei verschiedenen Geweben Knochenmark, Fettgewebe und Nabelschnurblut in hypoxischer und normoxischer Umgebung wurden diese mit einer sehr stabilen Zellmembran Färbung versehen. Die HWZ von PKH 26 beträgt > 100 Tage.

Die Zellen wurden trypsinisiert und bei 400 x g 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit PBS-EDTA resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, so dass  $\leq 25 \mu\text{l}$  zurückblieben. Es wurden 500  $\mu\text{l}$  Diluent C hinzugegeben. Weitere 500  $\mu\text{l}$  Diluent C wurden mit 2  $\mu\text{l}$  Färbemittel versetzt und ebenfalls hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde vermischt und anschließend für 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden 1 ml PBS-BSA (1 % ig) hinzugegeben und erneut für 1 min bei RT inkubiert. Dann wurden weitere 2 ml PBS-BSA (1 % ig) hinzugegeben und für 5 min bei 500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde resuspendiert und die Zellen wurden in ein

neues Röhrchen überführt. Anschließend wurden sie dreimal gewaschen, in dem sie bei 400 x g 5 min zentrifugiert und mit PBS resuspendiert worden sind. Im letzten Waschvorgang wurde das Zellpellet mit MSCGM resuspendiert. Schließlich wurden die Zellen in passende Kulturgefäße gegeben und je die Hälfte jedes hMSC Typs in einen CO<sub>2</sub>-Brutschrank mit hypoxischem und normoxischem Milieu gebracht und für 3 Wochen wie gewohnt kultiviert.

Die Hypoxie wurde in einer Hypoxie-Kammer durch den Einstrom von Stickstoff in die sonst luftdichte Kammer hergestellt. Somit wurde der Sauerstoff verdrängt und der O<sub>2</sub>-Gehalt betrug 0-5 %. Die Zellen außerhalb der Kammer waren dem normalen 20,946 % igem O<sub>2</sub>-Gehalt der Luft ausgesetzt. An den Tagen 0, 7, 14 und 21 wurden jeweils Proben genommen, indem die Zellen trypsinisiert und ca. 5.000 Zellen zur FACS Analyse vorbereitet worden sind.

### **2.10.3. FACS Analyse**

Die FACS Analyse wurde wie gewohnt durchgeführt. Mit Flächendiagrammen wurde das Proliferationsverhalten der Zellen unterschiedlicher Herkunft an den Tagen 0, 7, 14 und 21 in Hypoxie und Normoxie verglichen.

## 2.11. Analyse der Kalziumaktivität von NRCM mittels Live-Cell-Imaging

### 2.11.1. Materialien

Produktbeschreibung	Katalognr.	Firma
Kulturmedium I:		
- DMEM	P04-03550	PAN Biotech
- 5%FBS	P30-3300	PAN Biotech
- 10%HS	B11-021	PAA Laboratories
- 1%P/S	P11-010	PAA Laboratories
Kulturmedium II:	s. Kulturmedium I	s. Kulturmedium I
- DMEM		
- 5%HS		
- 1%P/S		
Kulturschale mit Glasboden 35mm	P35GCol-0-14-C	MatTek Corporation
Indikatorfreies Medium: DMEM Medium w/o Phenolred	P04-03591	PAN Biotech
Fluo-4, AM	F14217	Molecular Probes™
Pluronic F-127	P3000MP	Molecular Probes™

### 2.11.2. Kultivierung der NRCM

Die für diesen Versuch benötigten neonatalen Kardiomyozyten der Ratte (NRCM) wurden mir von den Forschungslaboratorien für Kardialen Gewebe- und Organersatz (FKGO) der Universität Rostock zur Verfügung gestellt.

Die NCRM wurden in Kulturflaschen überführt, welche zuvor mit Fibronektin überzogen wurden, indem eine PBS-EDTA Lösung mit  $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Fibronektin über Nacht in der Flasche ruhte. Im Kulturmedium I wurden die Zellen im  $\text{CO}_2$ -Brutschrank, bei 5%  $\text{CO}_2$  und  $37^\circ\text{C}$  für 24 Std. kultiviert. Am zweiten Tag wurde auf das Kulturmedium II gewechselt. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen wie gewohnt gewaschen und das Medium erneuert.

Nach ca. 10 Tagen konnte man einzelne sich kontrahierende Zellen unter dem Lichtmikroskop beobachten. Die Zellen wurden auf eine spezielle Kulturschale mit Glasboden, bedeckt mit Kollagen, gesetzt, die später die Analyse mittels des Konfokalen Laser Rastermikroskops erlaubte.

---

### **2.11.3. Kalzium-Färbung**

Um die Kalziumbewegung in den NRCM zu beobachten wurde ein spezieller fluoreszierender Kalzium Indikator verwendet, das Fluo-4<sup>63</sup> und ein Konfokales Laser Rastermikroskop<sup>64</sup>.

Die Zellen, die auf der speziellen Schale gewachsen waren, wurden mit indikatorfreiem Medium gewaschen, indem sie für 30 min bei 37°C inkubierten. Währenddessen wurde eine 1 µm-Arbeitslösung hergestellt, Fluo-4 und Pluronic wurden 1:1000 mit PBS verdünnt. Die Zellen wurden anschließend mit dem Färbemittel bedeckt und für 60 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen noch einmal mit PBS-EDTA gewaschen und zum Schluss mit indikatorfreiem Medium bedeckt.

### **2.11.4. Analyse mittels Live-Cell-Imaging**

Die Analyse erfolgte mit dem Konfokalen Laser Rastermikroskop. Auf Grund der Live-Cell-Imaging Analyse wurde um das Mikroskop herum ein abgeschlossener Inkubator auf 5% CO<sub>2</sub> und 37°C vorbereitet.

Alle 656,994ms wurde ein Bild sowohl mit dem Durchlichtmikroskop als auch mit dem Konfokalen Laser Rastermikroskop aufgenommen. Später wurden diese Bilder überlappend als ein Video dargestellt.

### 3 ERGEBNISSE

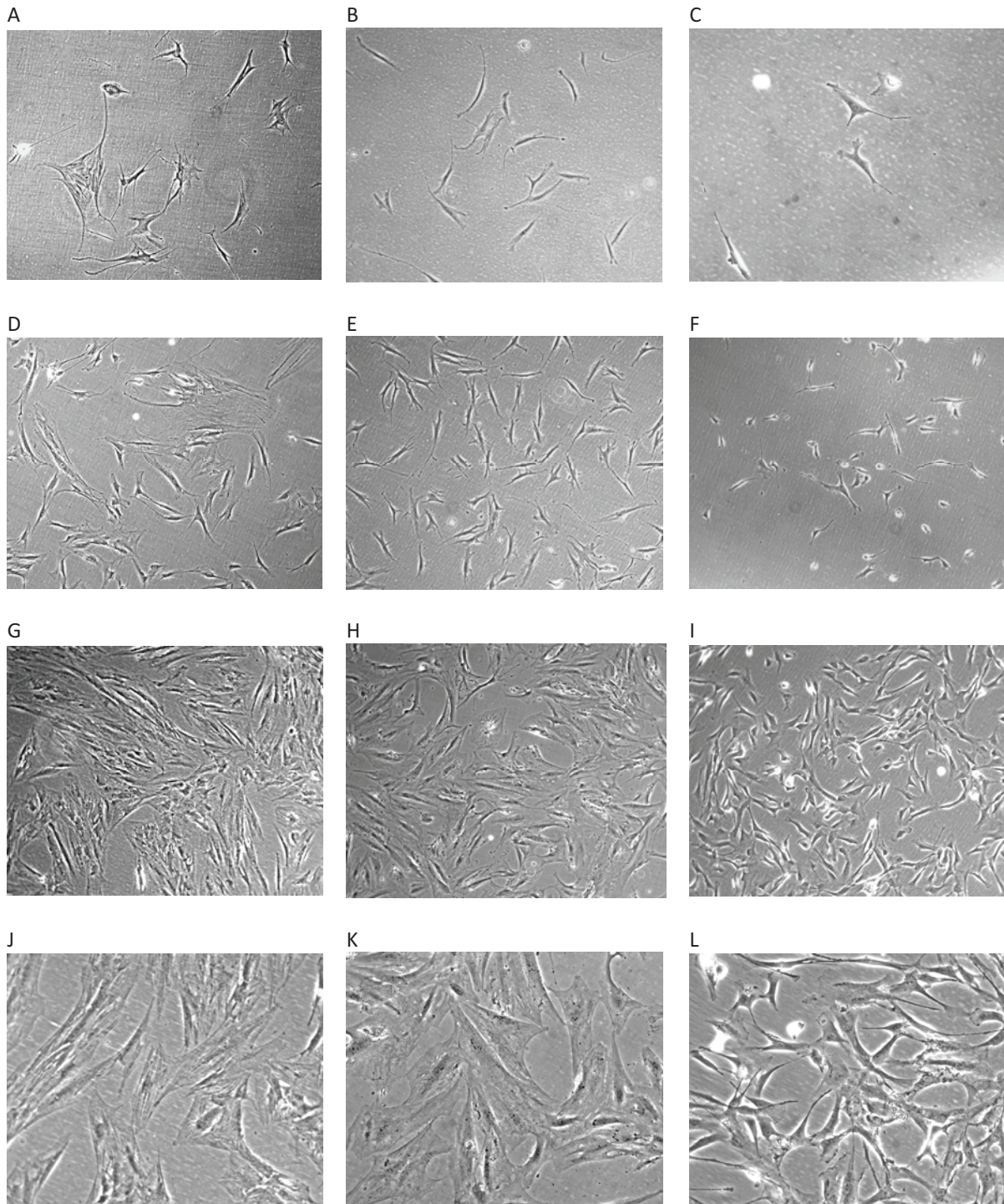
Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Arbeit dargestellt. Der erste Abschnitt beschäftigt sich mit der *in vitro* Charakterisierung von humanen Mesenchymalen Stammzellen im Hinblick auf Kultivierung und Wachstumsgeschwindigkeit sowie Oberflächenmarker und Differenzierungsmöglichkeiten. Der zweite Teil beschreibt die Ko-Kultivierung von CD133<sup>+</sup> Knochenmarkstammzellen mit C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, undifferenzier-ten skelettalen Myoblasten der Maus. Das Hauptaugenmerk wird hierbei auf die Differenzierung zu Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen gelegt.

#### 3.1. *In vitro* Charakterisierung und Untersuchung humaner Mesenchymaler Stammzellen

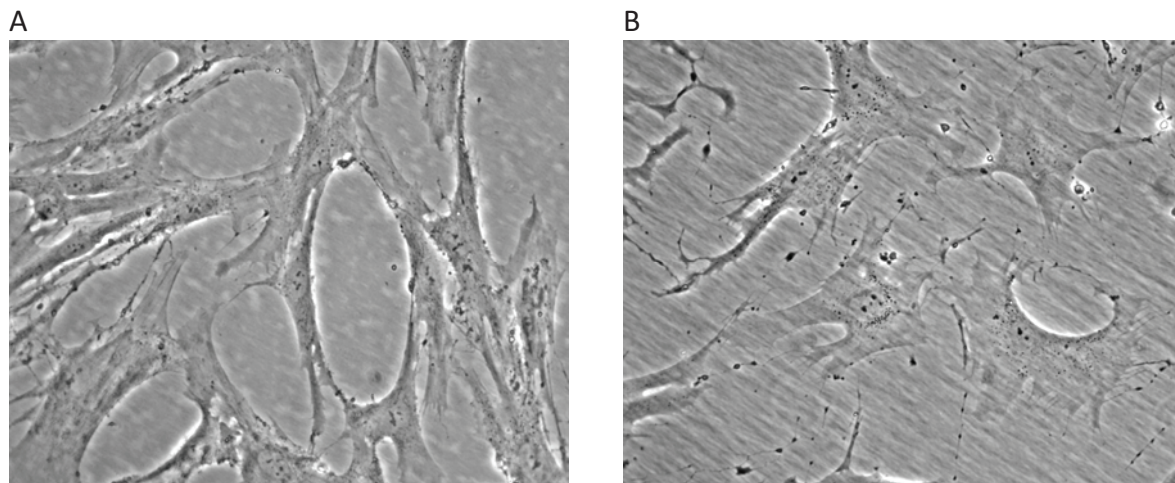
##### 3.1.1. Lichtmikroskopische Beobachtung

Die hMSC der drei unterschiedlichen Quellen Knochenmark (BM-hMSC), Nabelschnurblut (CB-hMSC) und Fettgewebe (PLA-hMSC) wurden einer täglichen Begutachtung mittels Lichtmikroskop unterzogen. Hierbei fielen deutliche Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit von den CB-hMSC zu den anderen beiden auf. CB-hMSC wuchsen sehr viel langsamer und waren somit schwieriger zu kultivieren. Die Morphologie wies ebenfalls Unterschiede auf (**Abb. 3.1**). Die PLA- und BM-hMSC waren sehr zart, sie wiesen einen fibroblastoiden Phänotyp auf (**Abb. 3.2**), wohingegen die CB-hMSC einen eher dreidimensionalen Phänotyp zeigten.





**Abbildung 3.1 A-L:** Lichtmikroskopische Aufnahmen von hMSC verschiedenen Ursprungs. A, D, G, J: BM-hMSC; B, E, H, K: PLA-hMSC; C, F, I, L: CB-hMSC. Darstellung nach 2 Tagen (A-C), 5 Tagen (D-F) und 15 Tagen (G-L) bei 100-facher (A-I) bzw. 200-facher (J-L) Vergrößerung.

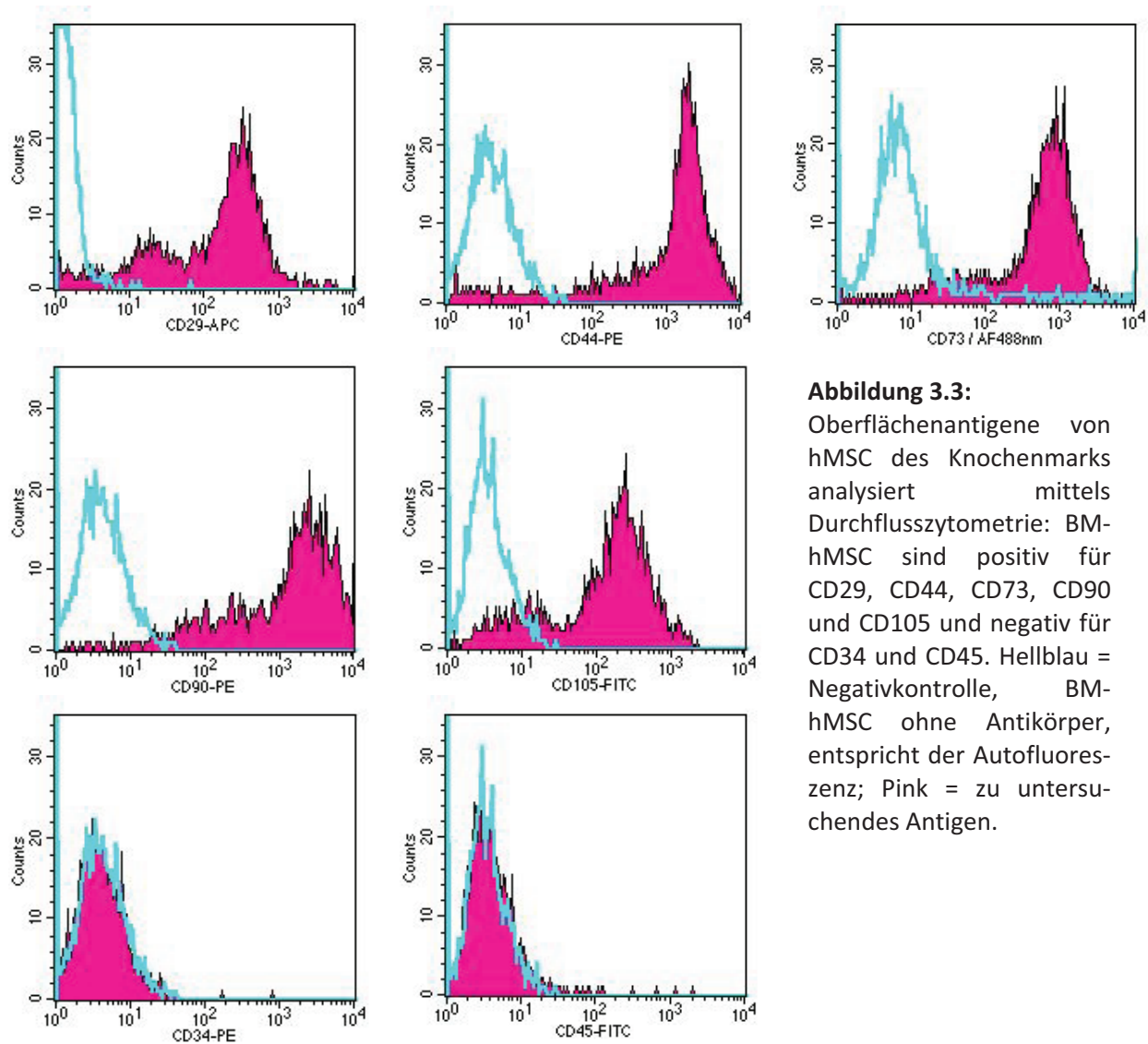


**Abbildung 3.2 A+B:** Lichtmikroskopische Aufnahme von BM- (A) und PLA-hMSC (B) in 400 facher Vergrößerung zur Verdeutlichung des fibroblastoiden Phänotyps.

### 3.1.2. Oberflächenantigen Analyse

Die Analyse der Oberflächenantigene von hMSC, hier am Beispiel der Zellen aus dem Knochenmark, mittels Durchflusszytometrie ergab, dass diese Zellen wie zu erwarten negativ für die hämatopoietischen Marker CD34 und CD45 sind. Stromazellmarker wie CD73, CD90 und CD105, das  $\beta$ 1-Integrin CD29 und das Adhäsionsmolekül CD44 waren hingegen in hoher Zahl nachweisbar (**Abb. 3.3**). Das Adhäsionsmolekül CD44 war bei Zellen des Knochenmarks und des Fettgewebes ebenfalls mit der Immunofärbung nachweisbar (**Abb. 3.4**). Da die hMSC eine sehr dünne Morphologie haben, sind Oberflächenantigene mit dem Konfokalen Laser Raster Mikroskop jedoch schwierig sichtbar zu machen.

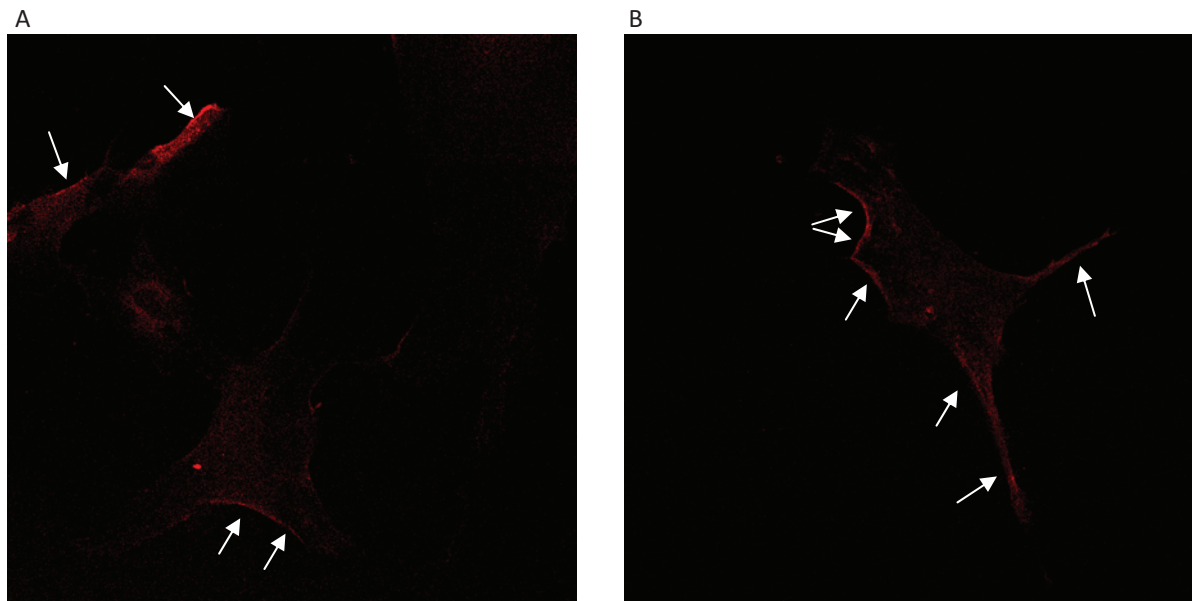
**Diagramm 3.1** stellt im Weiteren den Vergleich zwischen den hMSC der unterschiedlichen Ursprünge Knochenmark, Fettgewebe und Nabelschnurblut dar. Das Vorkommen der Oberflächenantigene auf den Zellen der drei Quellen ist ähnlich.



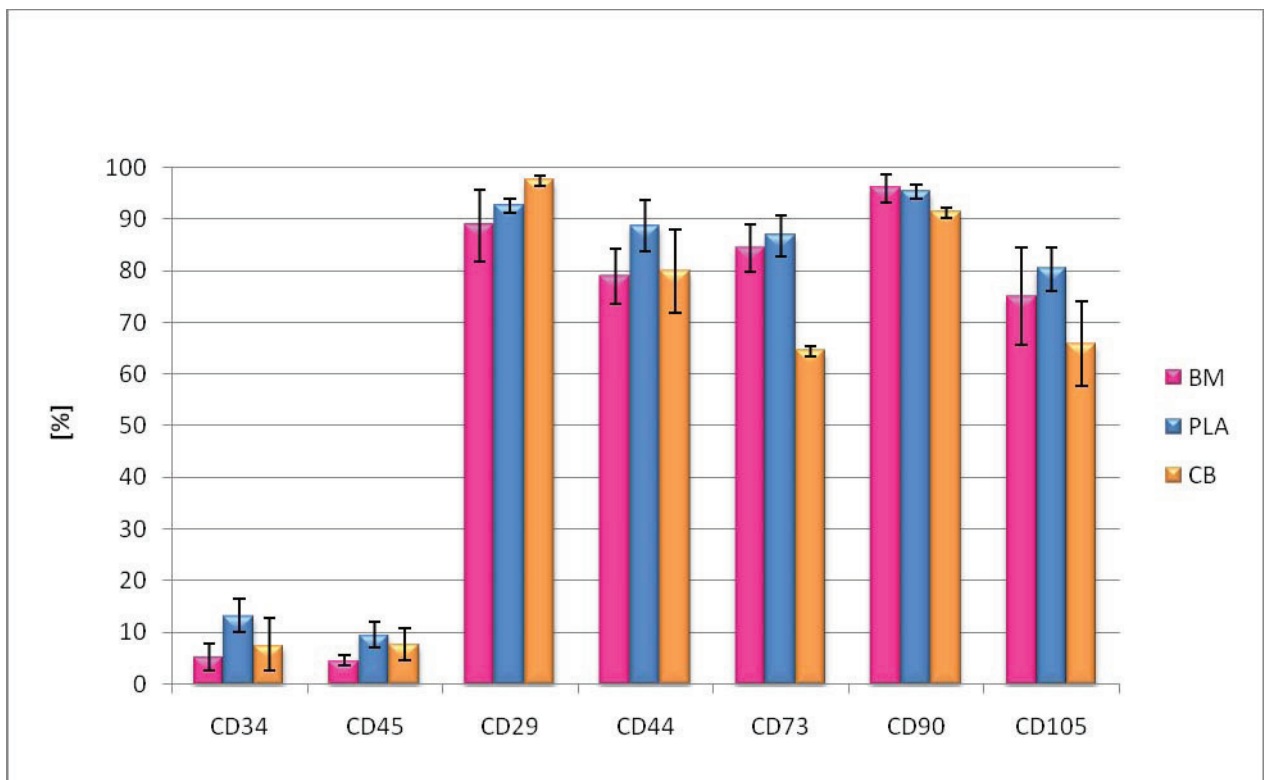
**Abbildung 3.3:**

Oberflächenantigene von hMSC des Knochenmarks analysiert mittels Durchflusszytometrie: BM-hMSC sind positiv für CD29, CD44, CD73, CD90 und CD105 und negativ für CD34 und CD45. Hellblau = Negativkontrolle, BM-hMSC ohne Antikörper, entspricht der Autofluoreszenz; Pink = zu untersuchendes Antigen.





**Abbildung 3.4 A+B:** Aufnahmen mit dem Konfokalen Laser Rastermikroskop. Das Adhäsionsmolekül CD44 wurde mit Hilfe der Immunofärbung der hMSC aus Knochenmark (A) und Fettgewebe (B) nachgewiesen.

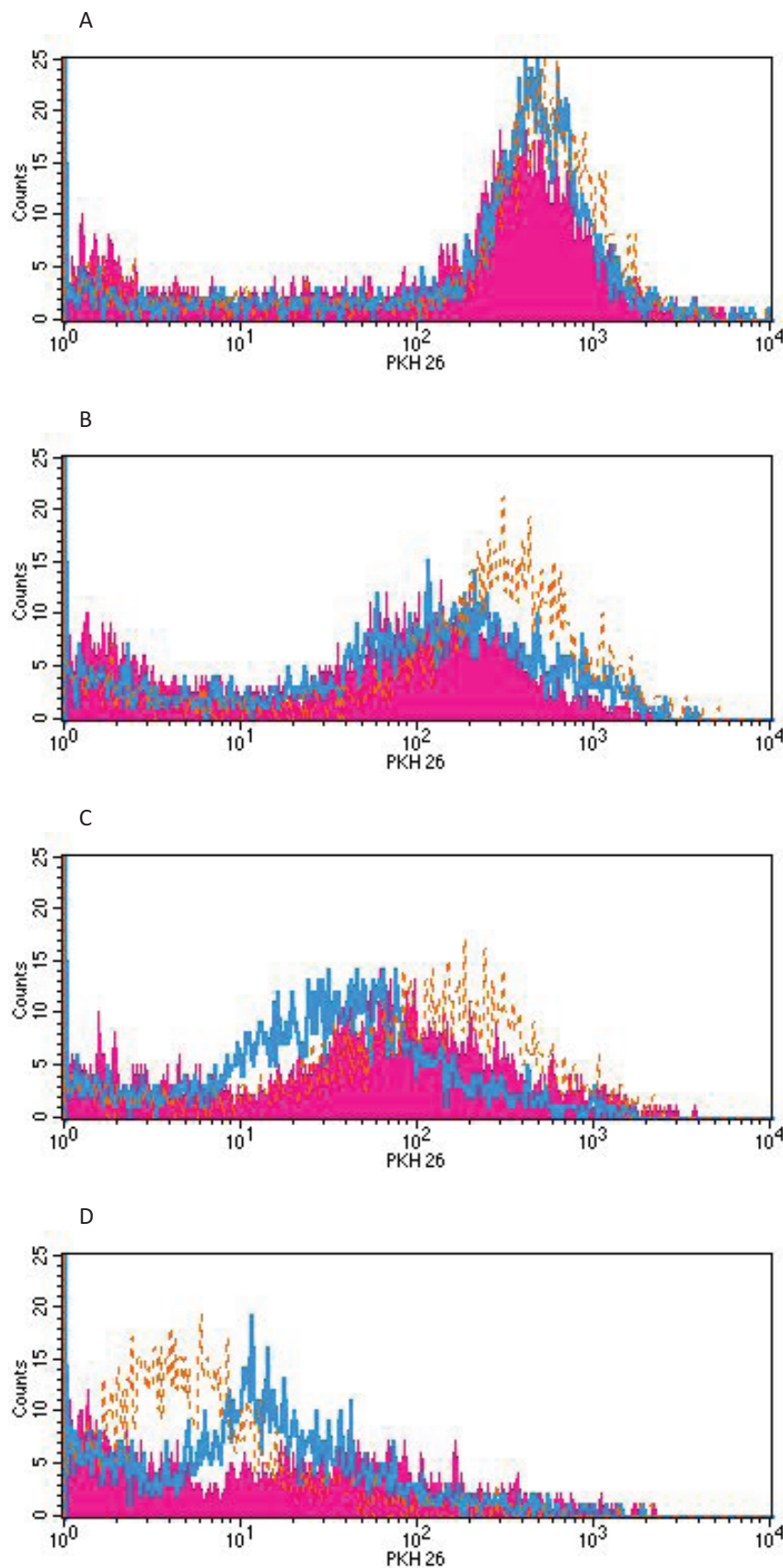


**Diagramm 3.1:** Oberflächenantigene von hMSC verschiedener Herkunft analysiert mittels FACS: BM = Knochenmark, PLA = Fettgewebe, CB = Nabelschnurblut.

### 3.1.3. Wachstumsvergleich der hMSC verschiedener Herkunft

Die lichtmikroskopischen Beobachtungen der Proliferationsgeschwindigkeit der hMSC verschiedener Herkunft korrelieren mit den Ergebnissen aus der FACS Analyse von den mit der Zellmembran Färbung PKH26 gefärbten hMSC (**Abb. 3.5**).

Die Intensität der PKH26 Färbung nimmt mit der Häufigkeit der Teilung ab, so dass man anhand des Verblassens der Zellen die Proliferationsgeschwindigkeit ableiten kann. Umso weniger intensiv die Zellmembran Färbung ist, desto häufiger haben sich diese Zellen bereits geteilt. Daraus resultiert, dass die Zellen aus dem Fettgewebe in den ersten zwei Wochen am schnellsten wachsen. Die hMSC aus dem Knochenmark wachsen in der ersten Woche noch gleich schnell, verlieren dann jedoch an Geschwindigkeit. Die Zellen aus dem Nabelschnurblut scheinen in den ersten ein bis zwei Wochen kaum zu wachsen. An Tag 21 hingegen ist ein deutlicher Proliferations-schub zu erkennen.



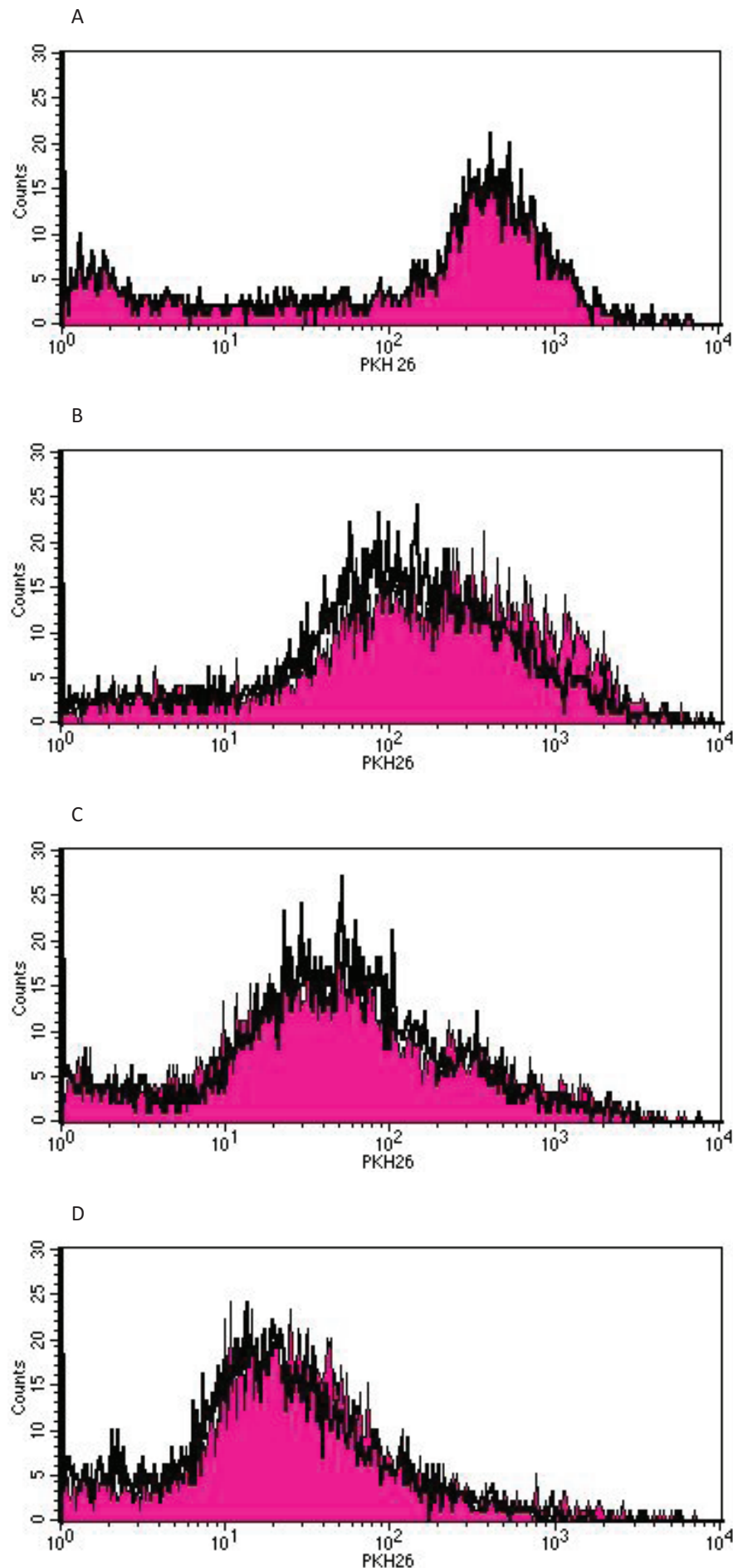
**Abbildung 3.5 A-D:**

Wachstumsvergleich zwischen den hMSC verschiedener Herkunft in **normoxischer Umgebung**. Der Vergleich an Tag 0 (A), 7 (B), 14 (C) und 21 (D) zeigt, dass die Zellen aus dem Fettgewebe (blau) zu Anfang am schnellsten wachsen. Die hMSC aus dem Knochenmark (pink) wachsen in der ersten Woche noch gleich schnell, verlieren dann jedoch an Proliferationsgeschwindigkeit. Die Zellen aus Nabelschnurblut (orange) weisen in den ersten zwei Wochen eine deutliche Wachstumsverzögerung auf, welche jedoch in der dritten Woche nicht mehr nachzuweisen ist.

### 3.1.4. Wachstumsvergleich in normoxischer und hypoxischer Umgebung

Der Proliferationsvergleich der hMSC in normoxischer ( $O_2$ -Gehalt 20,946%) und hypoxischer ( $O_2$ -Gehalt 0-5%) Umgebung ergab, dass ein niedriger Sauerstoffgehalt das Zellwachstum positiv beeinflusst. Dies wird hier durch die FACS-Analyse der hMSC aus Knochenmark (**Abb. 3.6**) aus Fettgewebe (**Abb. 3.7**) und aus Nabelschnurblut (**Abb. 3.8**) verdeutlicht. Bei den hMSC aus BM fällt der nutzbringende Effekt nur geringfügig auf. Bei den Zellen aus PLA ist die günstige Wirkung in den ersten zwei Wochen gut zu sehen. Am 21. Tag jedoch scheinen die Zellen ähnlich schnell, die in normoxischer Umgebung sogar noch schneller zu proliferieren. Am besten sieht man den vorteilhaften Effekt der hypoxischen Umgebung bei den Zellen aus CB, am 21. Tag sind hier sogar kaum noch Zellen für die Zählung vorhanden, obwohl identische Kultivierungsprotokolle verwendet wurden.

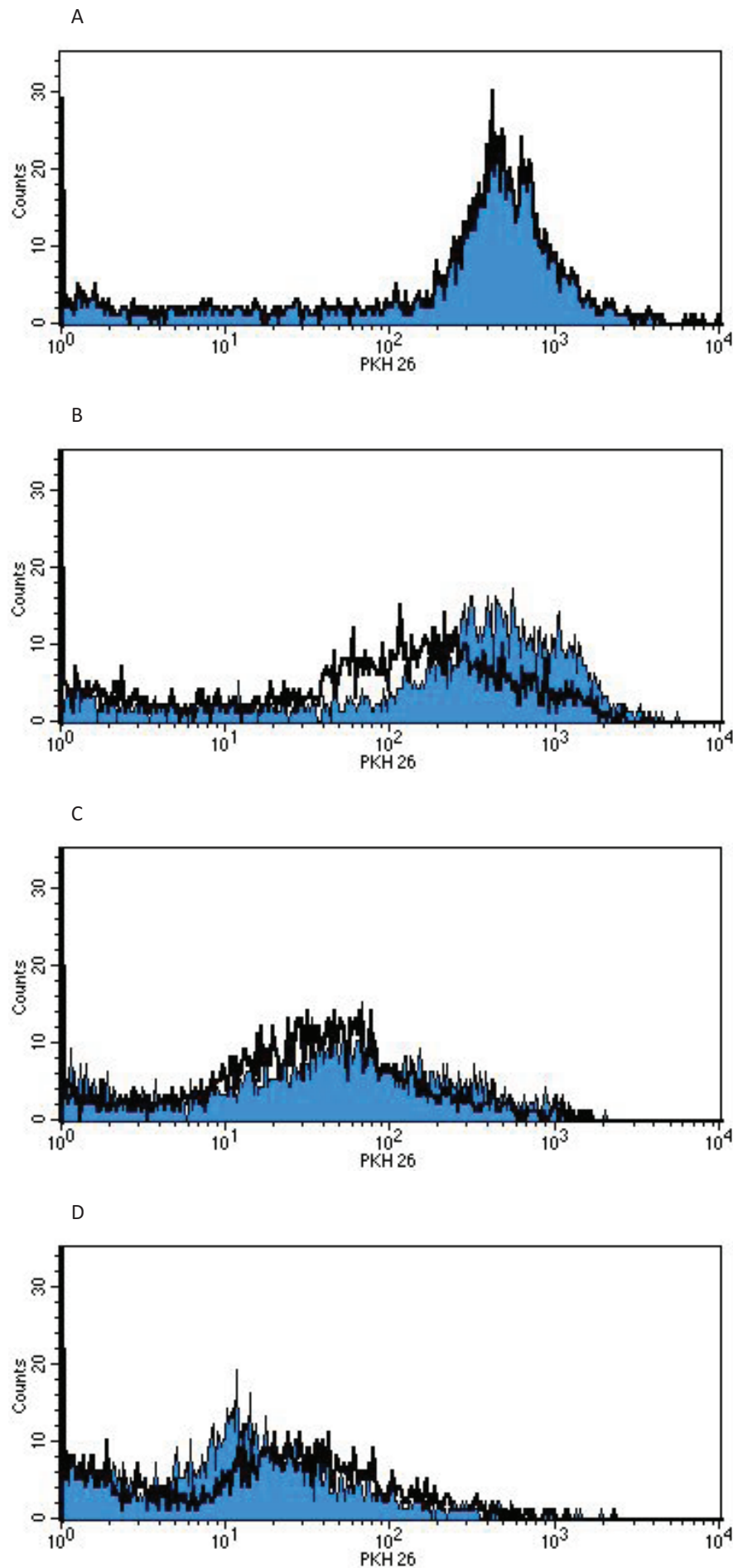
**Abbildung 3.9** zeigt noch einmal den Vergleich der drei unterschiedlichen Abstammungen in hypoxischer Umgebung, wobei sich unter dieser Fragestellung ähnliche Ergebnisse wie in normoxischem Milieu ergaben.



**Abbildung 3.6 A-D:**

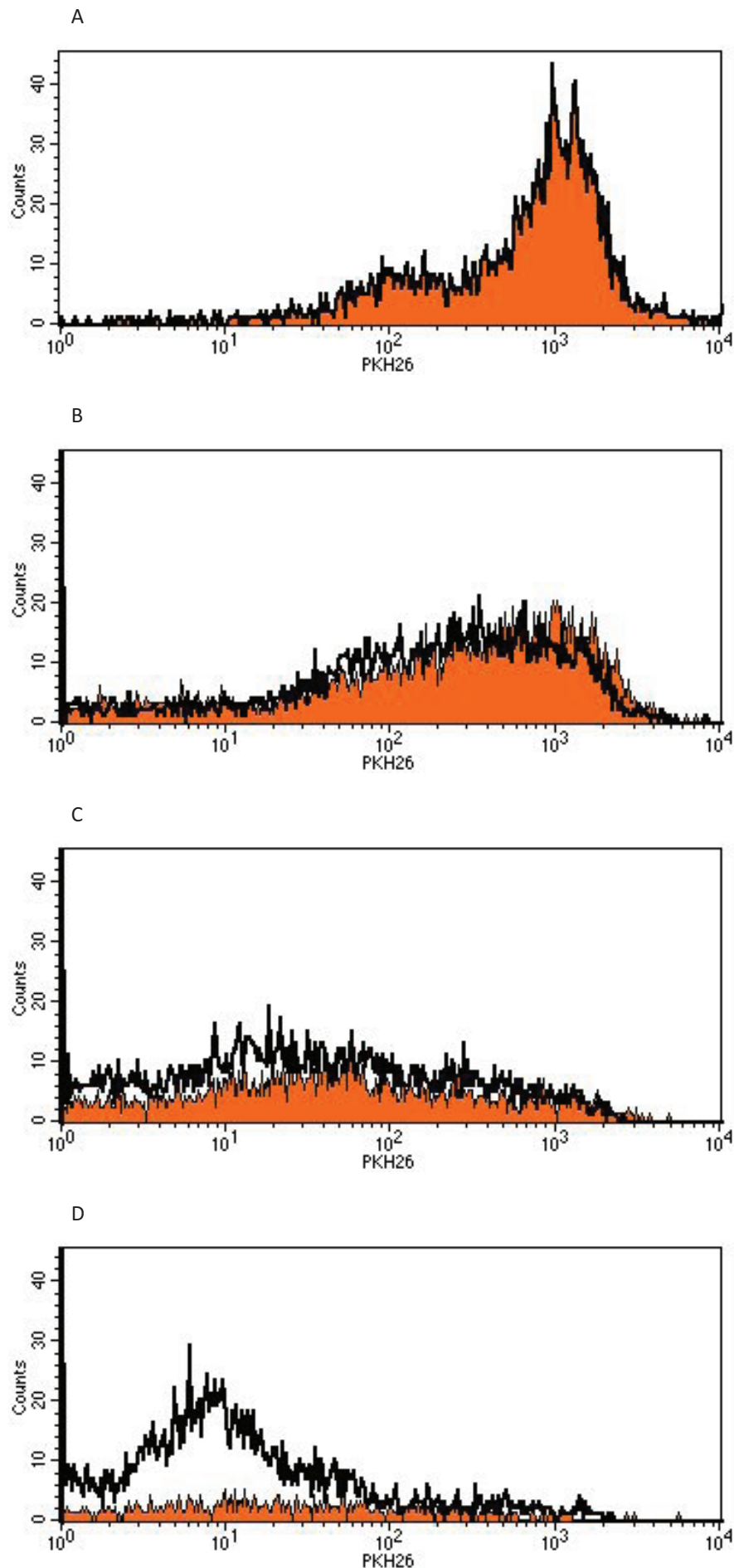
Wachstumsvergleich zwischen Zellen, die in normoxischer (pink) und in hypoxischer (schwarze Linie) Umgebung gewachsen sind am Beispiel von hMSC aus **Knochenmark**. Der Vergleich an Tag 0 (A), 7 (B), 14 (C) und 21 (D) zeigt lediglich einen sehr geringen Wachstumsvorteil für die Zellen in hypoxischer Umgebung.





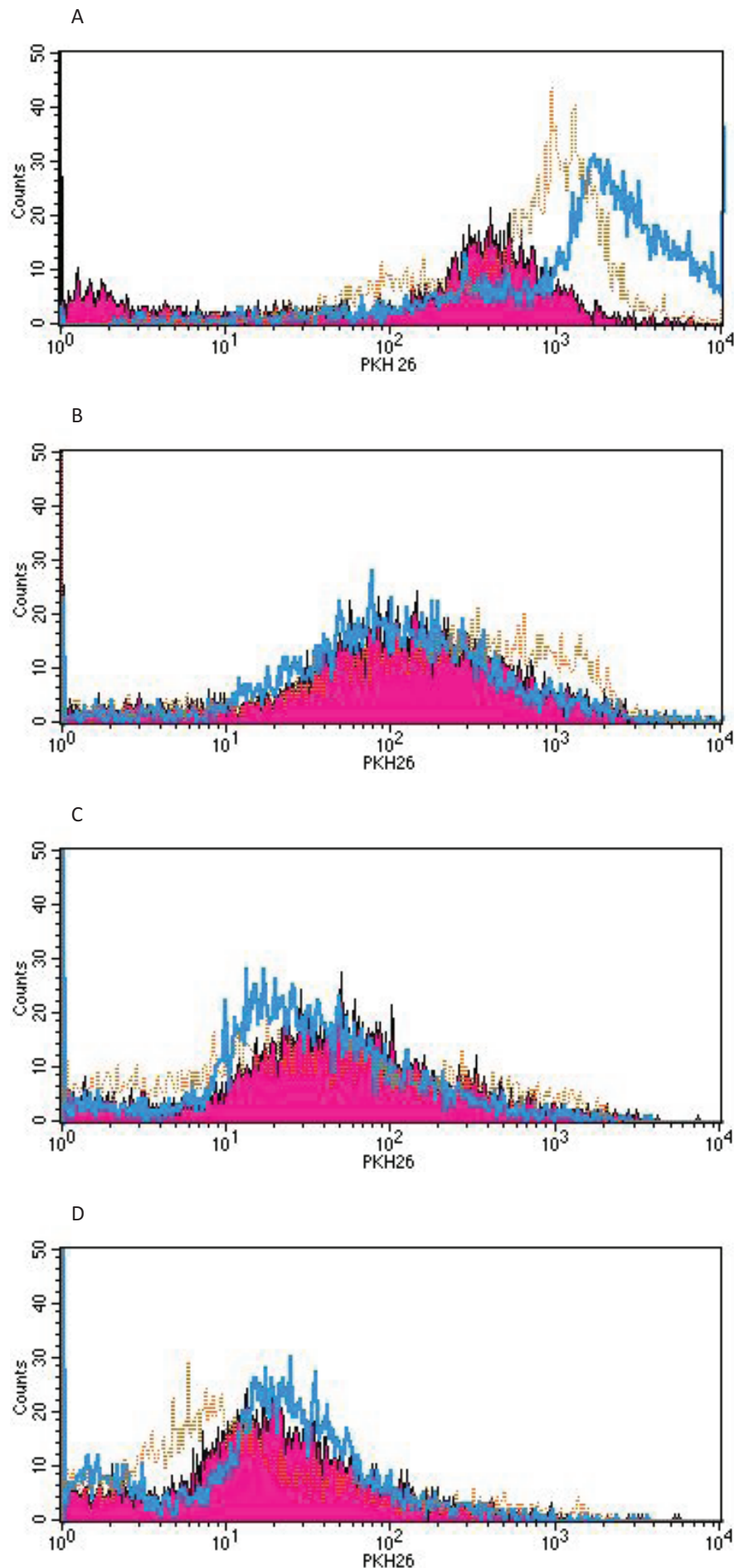
**Abbildung 3.7 A-D:**

Wachstumsvergleich zwischen Zellen, die in normoxischer (blau) und in hypoxischer (schwarze Linie) Umgebung gewachsen sind am Beispiel von hMSC aus **Fettgewebe**. Der Vergleich an Tag 0 (A), 7 (B), 14 (C) und 21 (D) beweist, dass hypoxisches Milieu das Zellwachstum dieser Zellen in den ersten zwei Wochen positiv beeinflusst.



**Abbildung 3.8 A-D:**

Wachstumsvergleich zwischen Zellen, die in normoxischer (orange) und in hypoxischer (schwarze Linie) Umgebung gewachsen sind am Beispiel von hMSC aus **Nabelschnurblut**. Der Vergleich an Tag 0 (A), 7 (B), 14 (C) und 21 (D) zeigt hier sehr deutlich, dass das hypoxische Milieu positiv auf die Zellproliferation wirkt.



**Abbildung 3.9 A-D:**

Wachstumsvergleich zwischen den hMSC verschiedener Herkunft in **hypoxischer Umgebung**. Der Vergleich an Tag 0 (A), 7 (B), 14 (C) und 21 (D) zeigt ähnliche Ergebnisse wie der Vgl. in normoxischer Umgebung (Abb. 3.5). Die Zellen aus dem Fettgewebe (blau) wachsen zu Anfang am schnellsten. Die hMSC aus dem Knochenmark (pink) wachsen in der ersten Woche noch gleich schnell, verlieren dann jedoch an Proliferationsgeschwindigkeit. Die Zellen aus Nabelschnurblut (orange) weisen in der ersten Woche eine deutliche Wachstumsverzögerung auf, welche jedoch in der dritten Woche nicht mehr nachzuweisen ist.

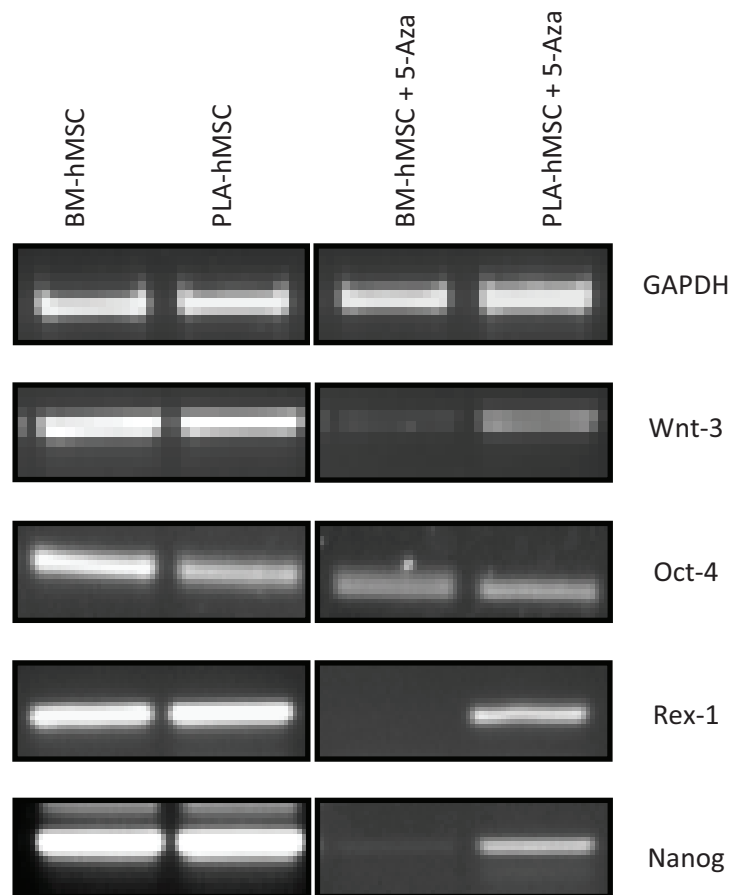
## Oberflächenbehandlung mit 5-Azacytidin

Die hMSC wurden für zwei Wochen mit dem DNA demethylierenden Cytosin-Analogon 5-Azacytidin behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen in dreierlei Hinsicht untersucht, um die Frage der Differenzierung zu Kardiomyozyten zu klären.

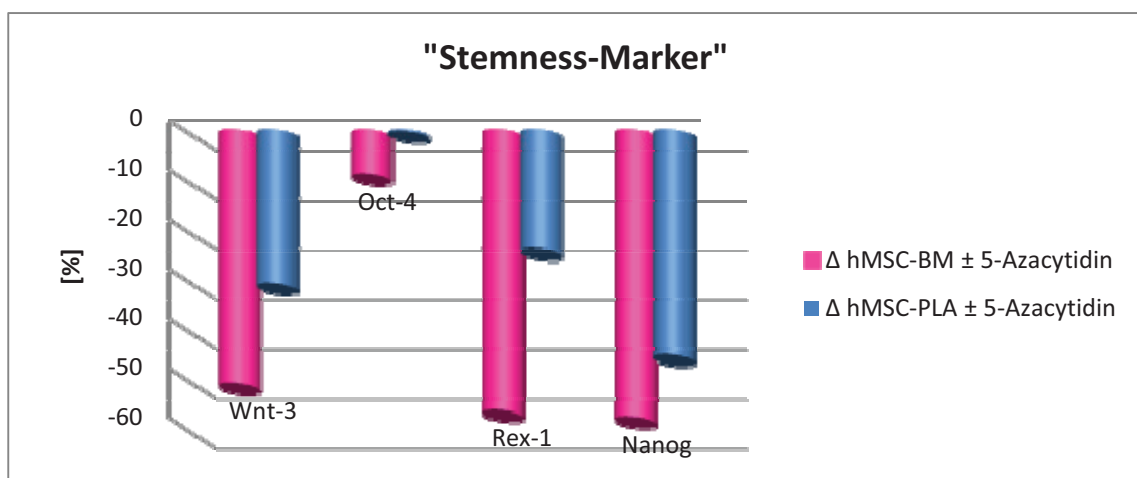
Die Untersuchung der RNA der hMSC mit und ohne 5-Azacytidin Behandlung sollte Aufschluss über die Differenzierung zu Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen bringen. Zur Durchführung der RT-PCR wurden sog. Stemness Marker verwendet. Das Ergebnis der Agarose Gel-Elektrophorese zeigt deutlich hellere Banden bei den unbehandelten Zellen als bei den behandelten (**Abb. 3.10**). Darüber hinaus verdeutlicht das **Diagramm 3.2** dieses Ergebnis eindrucksvoll.

Die FACS-Analyse der Oberflächenmarker der hMSC aus Knochenmark und Fettgewebe mit und ohne 5-Azacytidin zeigen die **Diagramme 3.3** und **3.4**.

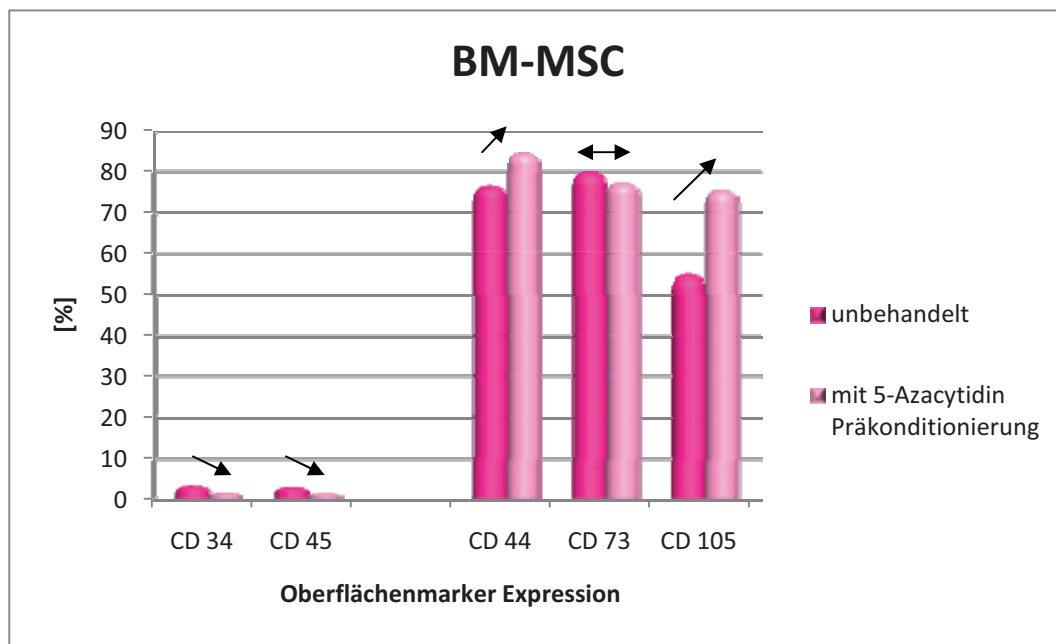
Die Immunofärbung des *Myocyte enhancer factors-2C* (MEF-2C) und anschließende Untersuchung mit dem Konfokalen Laser Rastermikroskop zeigt ein positives Signal im Kern der behandelten hMSC (**Abb. 3.11 H**). Im Vergleich zu einer unbehandelten Zelle kommt dies noch deutlicher zum Vorschein (**Abb. 3.11 C**).



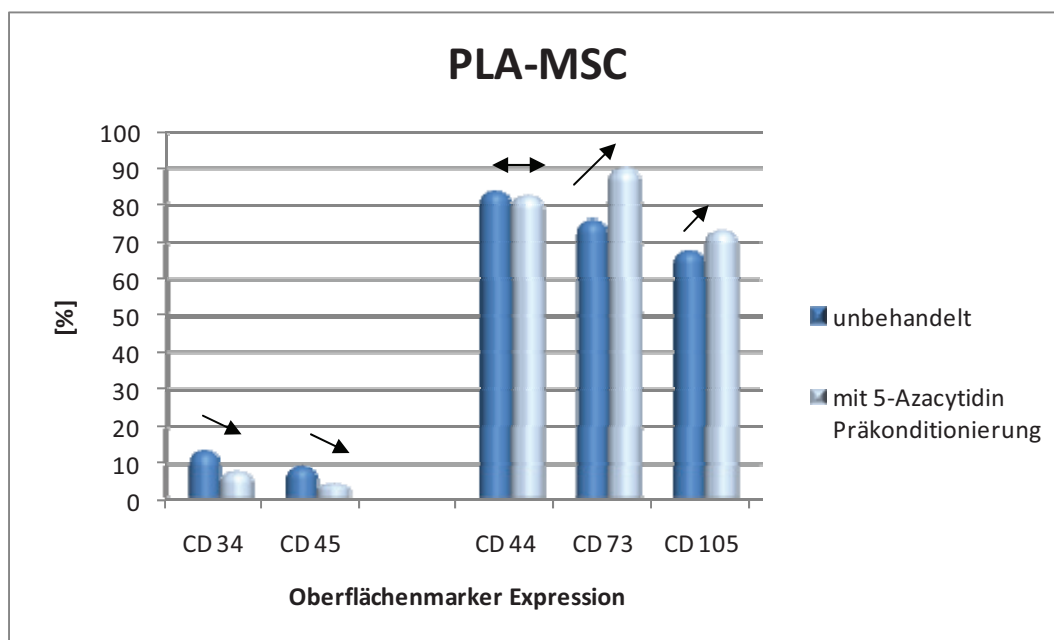
**Abbildung 3.10:** Gelelektrophoretische Darstellung der cDNA von hMSC mit und ohne 5-Azacytidin (5-Aza) Behandlung. Die behandelten Zellen weisen eine geringere Ausprägung der Stemness Marker auf, was auf eine Differenzierung hinweist.



**Diagramm 3.2:** Quantifizierung der „Stemness“-Marker-Abschwächung nach 5-Azacytidin-Behandlung im Vergleich zur herkömmlichen Kultivierung ohne 5-Azacytidin. Gemessen an der Helligkeitsreduktion der Elektrophoresebanden.

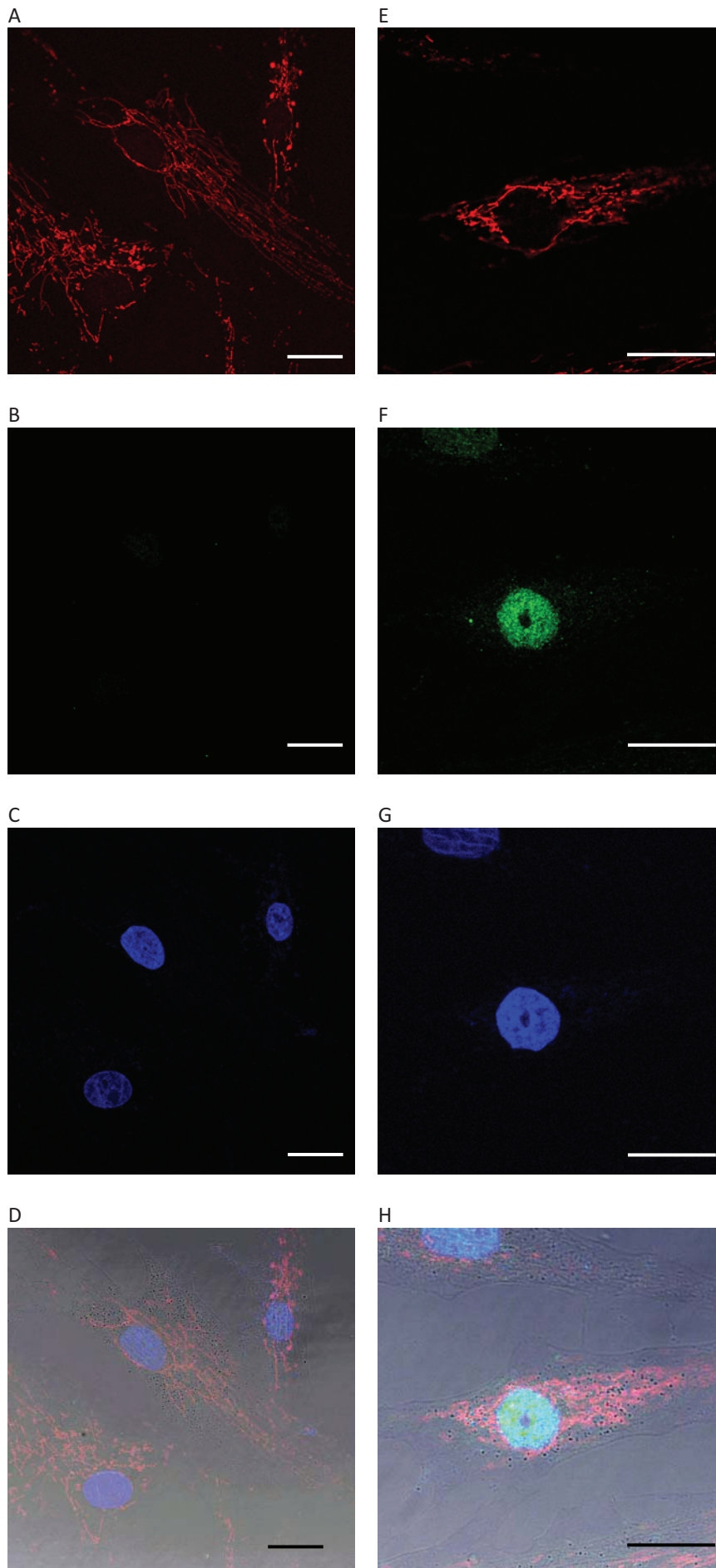


**Diagramm 3.3:** Veränderung der Oberflächenmarker Expression von unbehandelten hMSC aus dem Knochenmark im Vergleich zu mit 5-Azacytidin behandelten. Die hämatopoetischen Marker CD 34 und CD 45 haben sich noch weiter reduziert, die Expression der anderen Marker ist angestiegen (CD 44, CD 105), bzw. blieb relativ gleich (CD 73).



**Diagramm 3.4:** Veränderung der Oberflächenmarker Expression von unbehandelten hMSC aus dem Fettgewebe im Vergleich zu mit 5-Azacytidin behandelten. Die hämatopoetischen Marker CD 34 und CD 45 haben sich noch weiter reduziert, die Expression der anderen Marker ist angestiegen (CD 73, CD 105), bzw. blieb relativ gleich (CD 44).



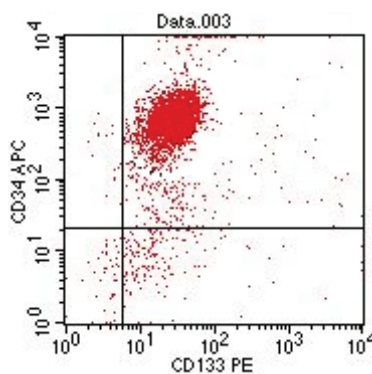


**Abbildung 3.11 A-H:** Immunfluoreszenzfärbung von hMSC. A-D: hMSC unbehandelt; E-H: Zwei Wochen mit 5-Azacytidin behandelt. Rot = humaner Mitochondrien Antikörper; Blau = Kernfärbung (Draq-5); D+H = Überlappende Bildausschnitte; Grün = Antikörper gegen *MEF-2C*: in (B) ist kein Signal zu sehen, in (F) ist ein sehr deutliches Signal zu sehen. Der eingezeichnete Messbalken entspricht jeweils 20μm.

### 3.2. Ko-Kultivierung von CD133<sup>+</sup> Knochenmarkstammzellen und C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myoblasten der Maus

#### 3.2.1. Reinheitsanalyse der CD133<sup>+</sup> Knochenmarkstammzellen

Nachdem die CD133<sup>+</sup> Knochenmarkstammzellen isoliert worden waren, wurden sie mittels Durchflusszytometrie auf ihre Reinheit hin analysiert (**Abb. 3.12**). Die Zellen konnten nur dann verwendet werden, wenn ihr Gehalt  $\geq 80\%$  war. Im Mittel lag der Reinheitsgrad bei 87,332  $\pm$  1,384 %.

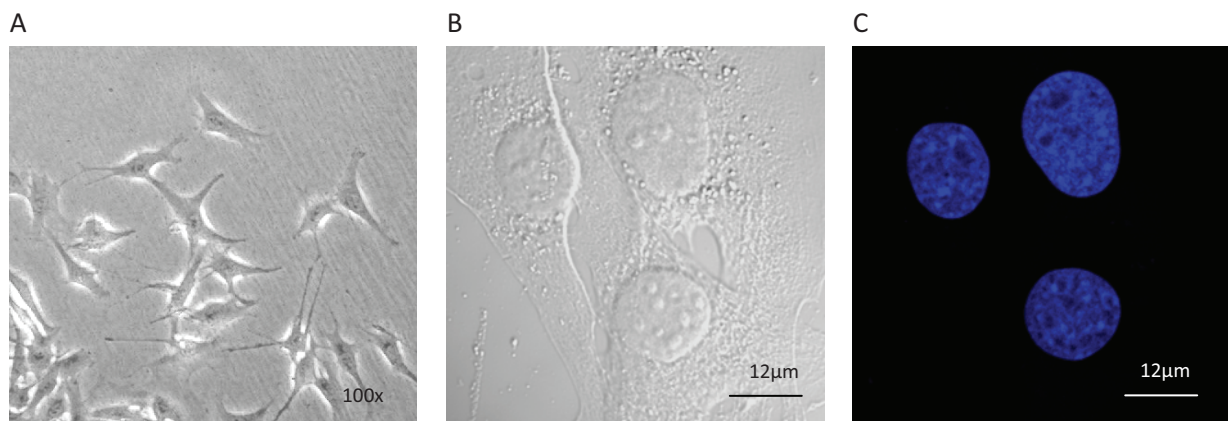


**Abbildung 3.12:** FACS Analyse: Der obere rechte Quadrant entspricht den Zellen, die positiv für CD34 und CD133 sind. Sie sind ebenfalls positiv für CD45 (ausgedrückt durch die rote Markierung, Festlegung einen Schritt zuvor, nicht angezeigt).

#### 3.2.2. Mikroskopische Betrachtung der Komponenten und der Ko-Kultur

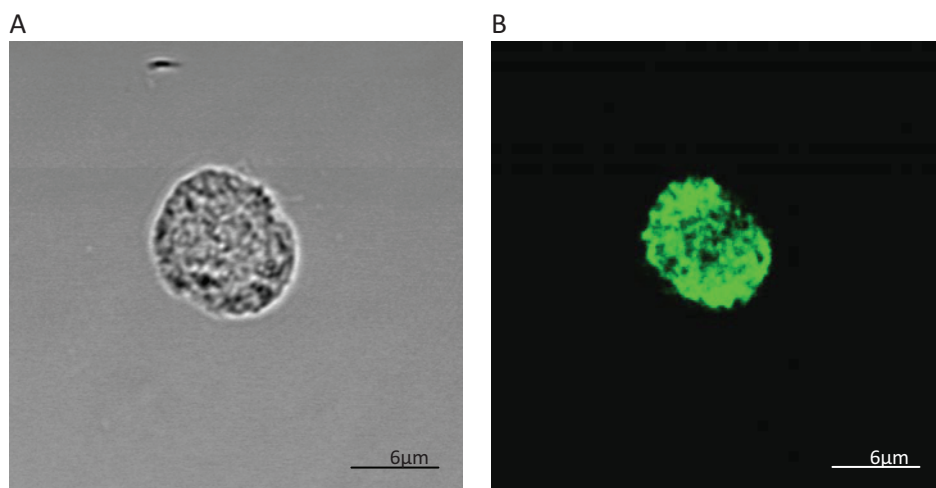
Die skelettale C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myoblasten-Zelllinie aus der Maus wurde einer täglichen lichtmikroskopischen Begutachtung unterzogen (**Abb. 3.13 A**). Dabei war darauf zu achten, dass sie nicht zu dicht wuchsen, damit sie ihre fibroblasten-ähnliche Morphologie behielten. Im Gegensatz zu den hMSC wirken sie jedoch weitaus dicker, was ihre Betrachtung mit dem Konfokalen Laser Rastermikroskop gegenüber der von hMSC vereinfachte (**Abb. 3.13 B+C**).





**Abbildung 3.13. A-C:** Betrachtung der Mausmuskelzelllinie  $C_2C_{12}$  mit dem Lichtmikroskop (A) und mit dem Konfokalen Laser Rastermikroskop im Durchlichtmodus (B) und mit der Kernfärbung Draq-5 (C).

Die humanen  $CD133^+$  Knochenmarkstammzellen sind nichtadhärente Zellen von einem Durchmesser von ca.  $10\mu m$  (**Abb. 3.14 A+B**).

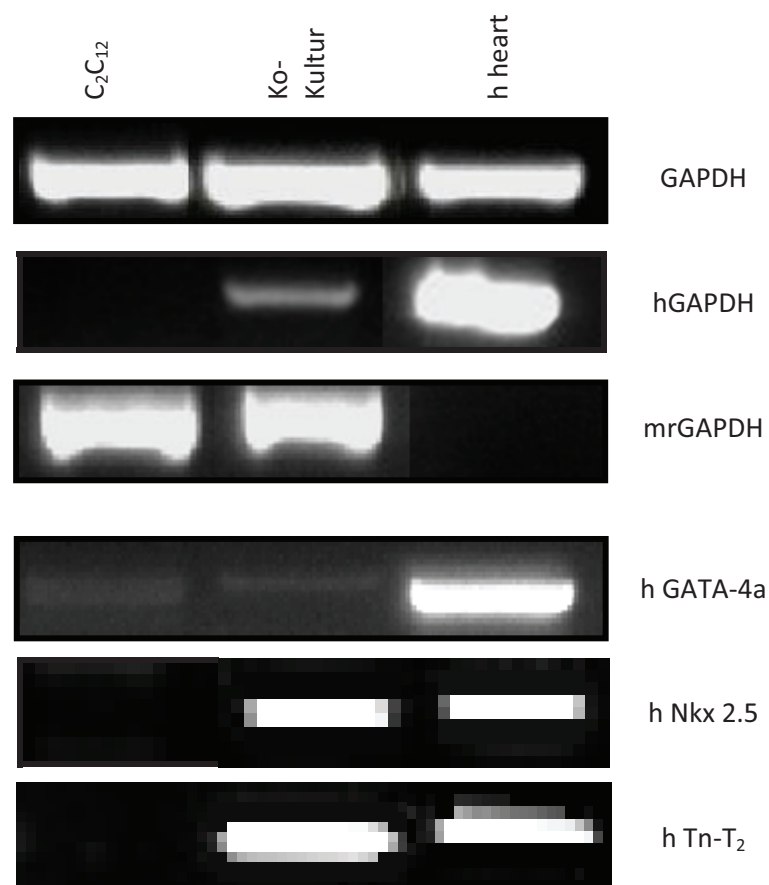


**Abbildung 3.14 A+B:** Immunfluoreszenzaufnahme einer  $CD133^+$  Stammzelle. (A) Durchlichtaufnahme, (B) gefärbt mit einem Antikörper gegen humane Zellkerne.

Die Ko-Kultur wurde ebenfalls lichtmikroskopisch beobachtet, hierbei waren jedoch keine Auffälligkeiten bezüglich einer Transdifferenzierung zu erkennen.

### 3.2.3. RT-PCR Analyse mit der Fragestellung der Differenzierung

Nach 14 Tagen der Kultivierung wurde parallel zur Immunfluoreszenzanalyse eine Analyse auf molekulargenetischer Ebene durchgeführt. Aus den Zellen der Ko- und Reinkultur, sowie aus menschlichen Herzzellen, wurde wie beschrieben die cDNA isoliert. Die PCR ergab die folgenden Ergebnisse (**Abb. 3.15**).



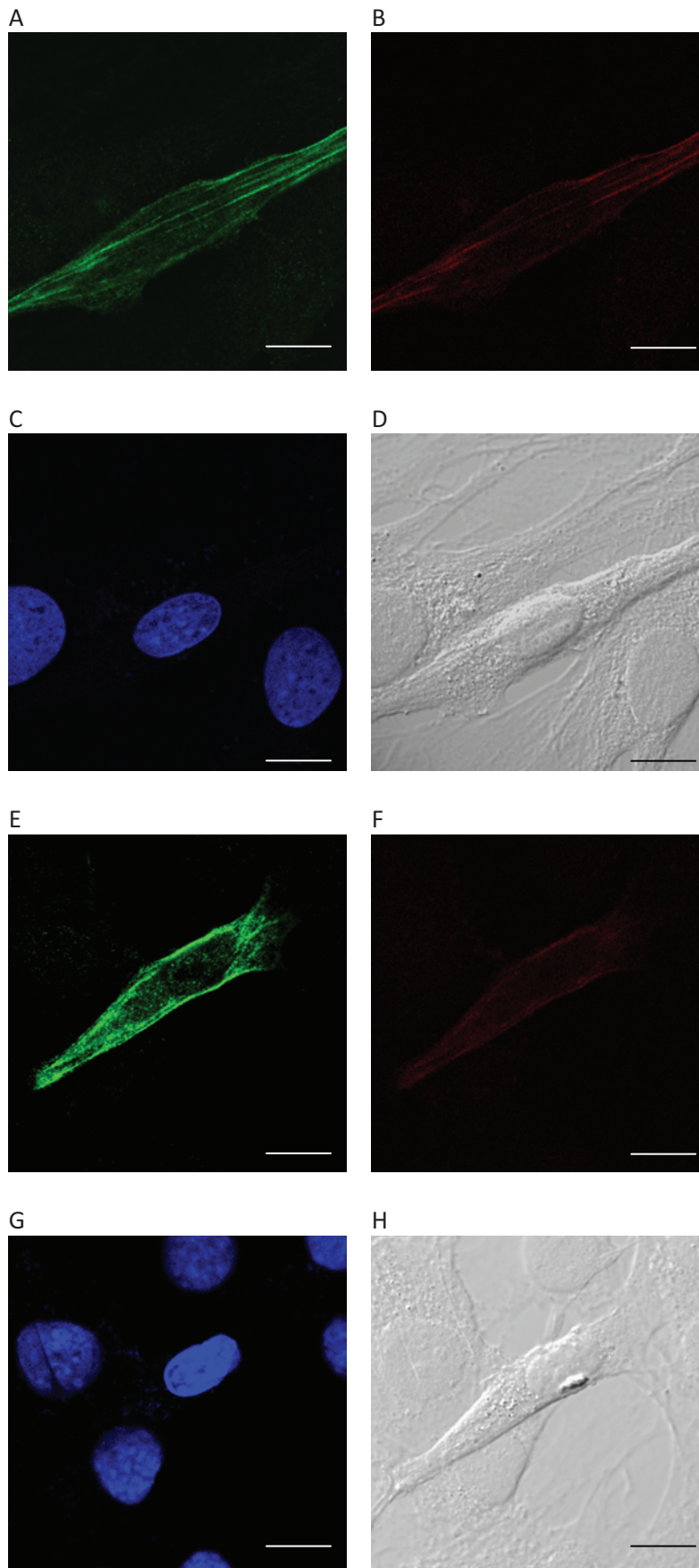
**Abbildung 3.15:** Gelelektrophoretische Darstellung der cDNA der Ko-Kultur, der C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Reinkultur als Negativkontrolle und menschlichen Herzzellen (h heart) als Positivkontrolle. Der menschliche Herzmarker *GATA-4a* zeigt ein zweifelhaftes Signal. Die Bande der Ko-Kultur bei den Primern *Nkx 2.5* und *Tn-T<sub>2</sub>* hingegen deutet auf eine Differenzierung der Stammzellen hin.

### 3.2.4. Immunfluoreszenzanalyse mit der Fragestellung der Differenzierung

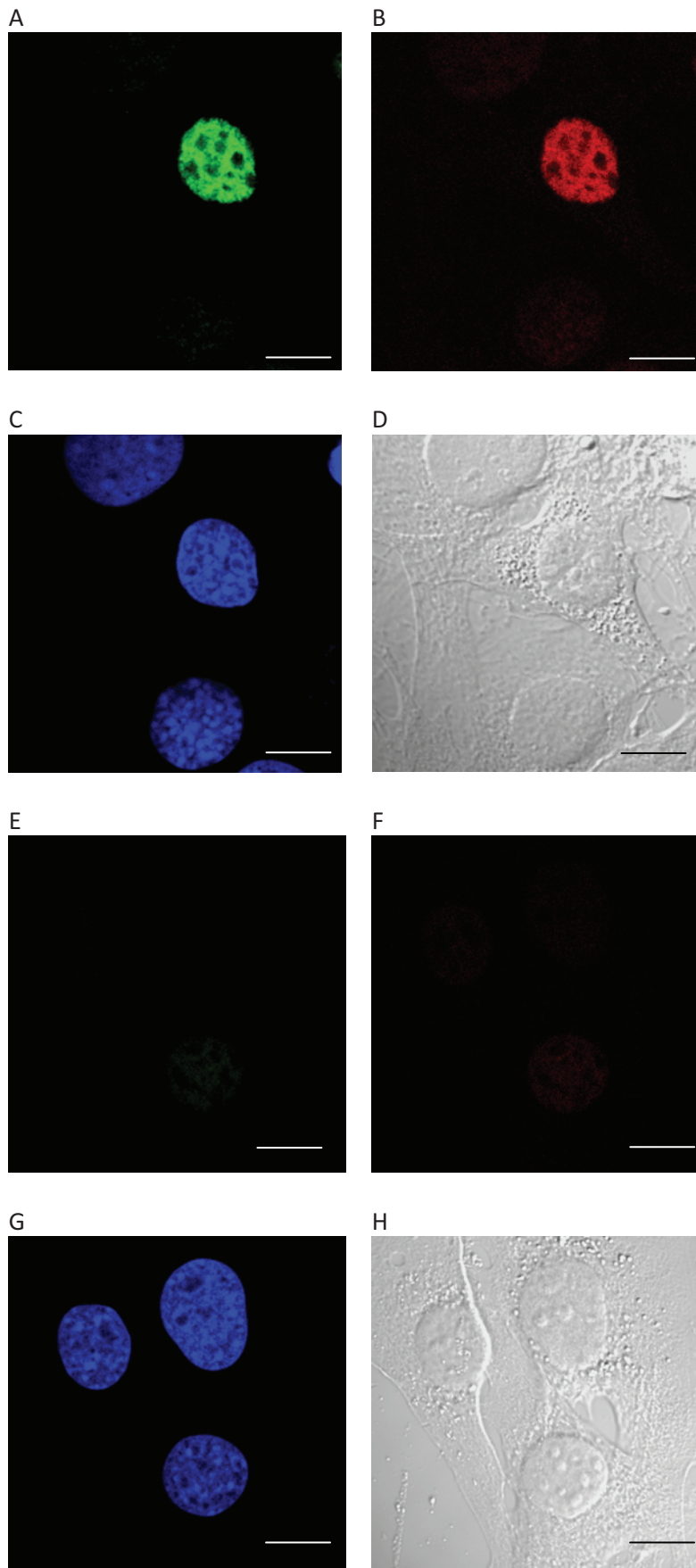
Nach 14 Tagen der Kultivierung wurden die Ko-Kulturen wie beschrieben mit Immunfluoreszenzfarbstoffen markiert und mittels eines Konfokalen Laser Rastermikroskops angesehen.

Die Immunofärbung des *Troponin I*, ein herzspezifisches myofibrilläres Protein und Untereinheit des Troponins, zeigt ein zweifelhaftes Signal. Sowohl die Färbung der Ko-Kultur (**Abb. 3.16 A**), als auch die Färbung der C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Reinkultur (**Abb. 3.16 E**) offenbart ein intrazytoplasmatisches myofibrilläres Färbemuster. Beide Kulturen weisen jedoch kein Signal für menschliche Kerne auf (**Abb. 3.16 B+F**).

Die Immunofärbung des Transkriptionsfaktors *Myocyte Enhancer Factor-2C* (MEF-2C) hingegen zeigt ein positives intranukleäres Signal in der Ko-Kultur (**Abb. 3.17 A**), ebenso ist eine positive Färbung für den Antikörper gegen menschliche Kerne sichtbar (**Abb. 3.17 B**). Der Vergleich mit der C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Reinkultur als Negativkontrolle macht dies noch deutlicher (**Abb. 3.17 E+F**).



**Abbildung 3.16 A-H:** Immunfluoreszenzaufnahmen von Ko-Kultur (A-D) und C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Reinkultur (E-H). Sowohl Ko- als auch Reinkultur zeigen ein positives intrazytoplasmatisches Signal mit der Färbung von **Troponin I** (grün). Beide Kulturen zeigen kein intranukleäres Signal mit der Anti-Human Nuclei Färbung (rot). Blau = Kernfärbung *Draq-5*; D+H = Durchlichtaufnahmen. Die eingezeichneten Messbalken entsprechen jeweils 12 μm.



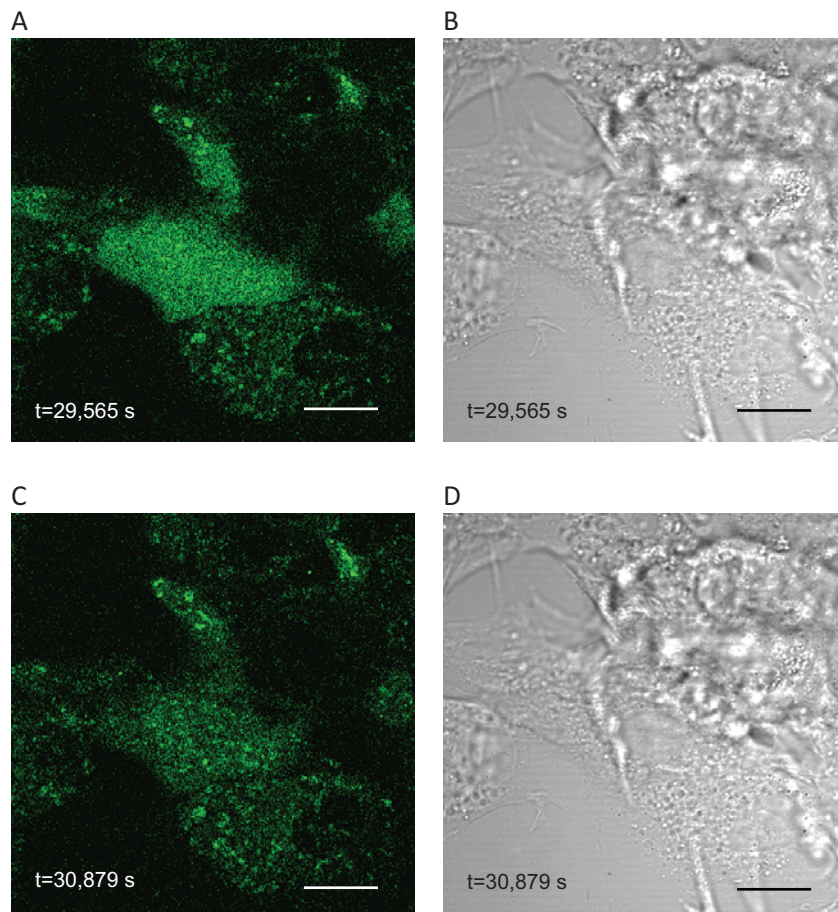
**Abbildung 3.17 A-H:** Immunfluoreszenzaufnahmen von Ko-Kultur (A-D) und C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Reinkultur (E-H). (A) zeigt ein positives intranukleäres Signal für **MEF-2C** (grün), (B) eines für Anti-Human-Nuclei (rot), Zeichen der Differenzierung. Die Negativkontrollen zeigen hier kein Signal (E+F). C+G = *Draq-5* Kernfärbung (blau); D+H = Durchlichtaufnahme. Die eingezeichneten Messbalken entsprechen jeweils 12 μm.

### 3.2.5. Ausarbeitung einer Positivkontrolle

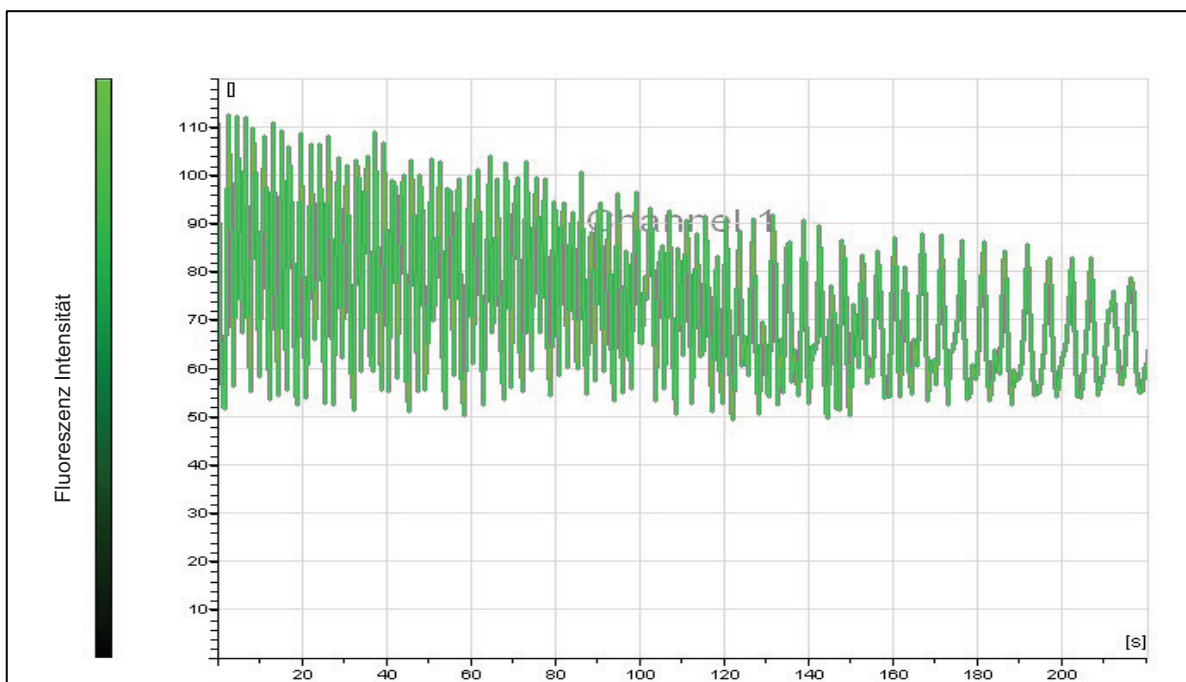
Zur Ausarbeitung einer Positivkontrolle wurden neonatale Kardiomyozyten der Ratte verwendet. Diese wurden wie beschrieben behandelt, um unter dem Konfokalen Laser Rastermikroskop die Kalziumdynamik der Zelle zu betrachten.

Die Aneinanderreihung der einzelnen Bilder, welche alle 657ms aufgenommen worden sind, ergibt ein Video, welches zum einen mit dem Durchlichtmodus die Kontraktionen der Zelle zeigt und zum anderen die fluoreszierenden Kalziumbewegungen präsentiert (**Abb. 3.18 A -D**). Diese werden mit einem Graphen noch verdeutlicht (**Abb. 3.19**). Bei einer sichtbar nicht schlagenden Zelle sind diese fluoreszierenden Kalziumbewegungen nicht erkennbar (**Abb. 3.20**). Der dazugehörige Graph veranschaulicht dies, es sind keine oszillierenden Fluoreszenzintensitätsunterschiede zu erkennen (**Abb. 3.21**). Die vereinzelt Peaks sind nicht als Kalziumbewegung zu deuten, was im Vergleich zu Abb. 3.21 deutlich wird.

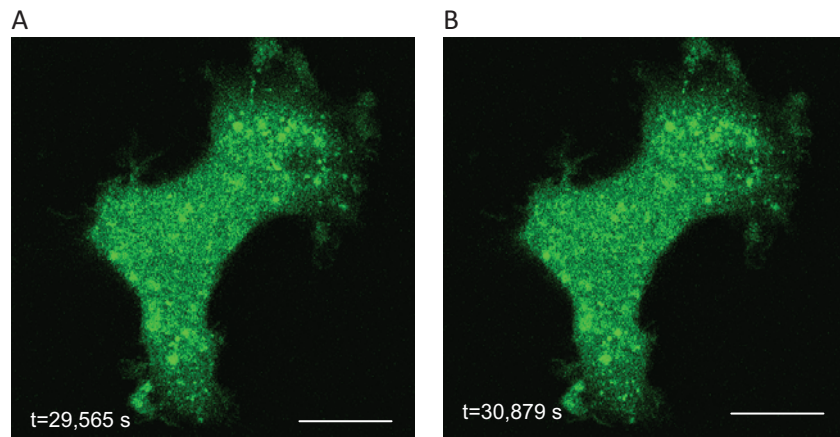




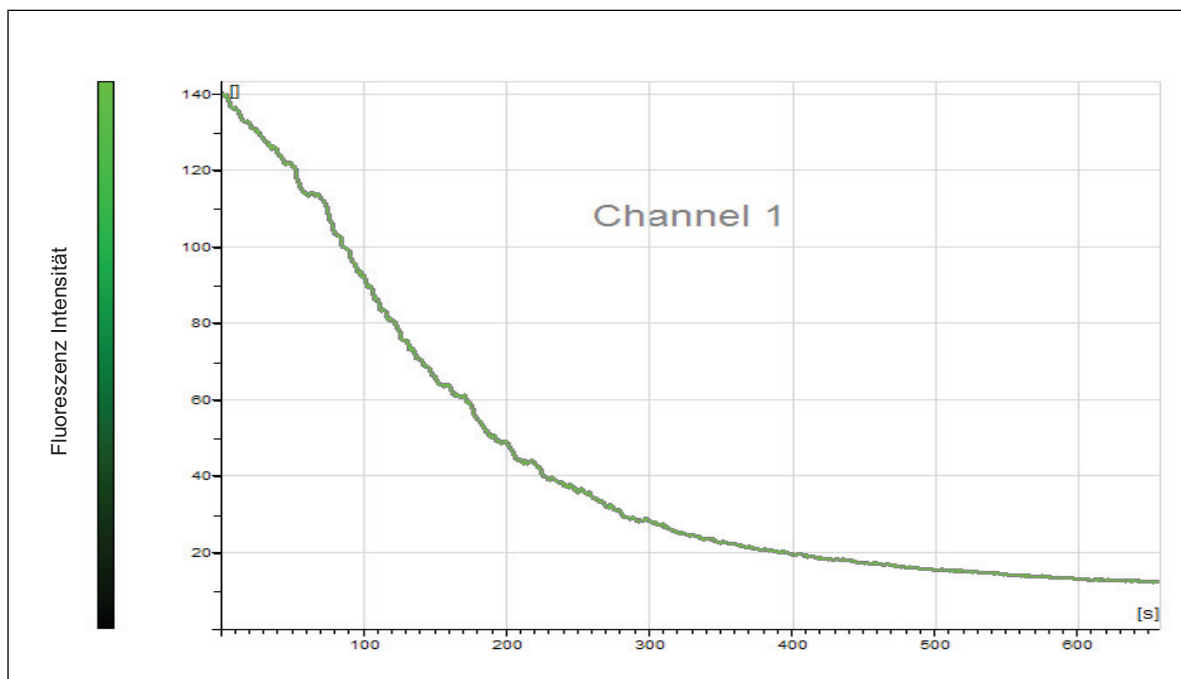
**Abbildung 3.18 A-D:** Bildausschnitte des Videos einer sich kontrahierenden neonatalen Rattenherzzelle. (A) und (C) zeigen die Zelle unter fluoreszierendem Licht zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die unterschiedliche Färbung verdeutlicht die Kalziumdynamik in der Zelle. (B) und (D) zeigen dieselbe Zelle als Durchlichtaufnahme, hier ist eine Kontraktion zu erahnen, welche erst im Video deutlich wird. Die eingezeichneten Messbalken entsprechen jeweils  $15 \mu\text{m}$ .



**Abbildung 3.19:** Graphische Darstellung der Kalziumdynamik einer sich kontrahierenden neonatalen Rattenherzzelle.



**Abbildung 3.20 A+B:** Bildausschnitte des Videos einer sich nicht kontrahierenden neonatalen Rattenherzzelle. (A) und (B) zeigen die Zelle unter fluoreszierendem Licht zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die sehr ähnliche Färbung zeigt, dass in dieser Zelle keine deutlich sichtbaren Kalziumbewegungen stattfinden, wie in einer sich kontrahierenden Zelle (s. Abb. 3.15). Die eingezeichneten Messbalcken entsprechen jeweils 15  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 3.21:** Graphische Darstellung der Kalziumdynamik einer sich nicht kontrahierenden neonatalen Rattenherzzelle.



## 4 DISKUSSION

Die Stammzellforschung in der Medizin gewinnt immer mehr an Bedeutung, wie die aktuellen bioethischen Diskussionen über das Embryonen Schutzgesetz zeigen<sup>65</sup>. Embryonale Stammzellen sind zusätzlich auf Grund ihres kanzerogenen Potentials in kontroverser Debatte<sup>66,67</sup>. Die weitaus weniger in ethischen Konflikten verstrickten und viel leichter zu gewinnenden adulten Stammzellen haben sich hingegen im Themenbereich der Organregeneration und -restauration vor allem in der Kardiologie einen Namen gemacht<sup>68</sup>. Außerdem wird ihnen die Fähigkeit zugesprochen, Regenerationsvorgänge im Knorpel zu fördern<sup>69</sup>, sowie die Therapie des Diabetes mellitus<sup>70</sup>, des Morbus Parkinson<sup>71</sup> und der Muskeldystrophie vom Typ Duchenne<sup>72,73</sup> zu unterstützen.

In dieser Arbeit wurden Mesenchymale Stammzellen charakterisiert, sowie deren kardiomyozytäres Differenzierungspotential und das der humanen CD133<sup>+</sup>-Knochenmarkstammzellen im Hinblick auf die Regeneration von Herzgewebe *in vitro* untersucht.

### 4.1 Charakterisierung humaner Mesenchymaler Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSC) wurden zum ersten Mal in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts von der Arbeitsgruppe um Friedenstein dargestellt<sup>74</sup>. Er beschrieb die spindelförmigen fibroblastoiden MSC als „Colony-forming Units-Fibroblasts“ (CFU-Fs), wie sie teilweise noch heute alternativ genannt werden<sup>75</sup>.

Diese Arbeit zeigt, dass die Zellen (1) mit minimalen Komplikationen zu isolieren, (2) einfach zu kultivieren, (3) relativ schnell zu expandieren ohne sich dabei zu differenzieren, (4) reproduzierbar zu charakterisieren und (5) gut zu manipulieren sind, womit sie sich interessant für das tissue-engineering und die Zelltherapie machen. Dass die MSC eine vielversprechende Therapieoption beim Zustand nach Myokardinfarkt bieten, zeigten bereits viele Arbeitsgruppen<sup>40, 76, 77, 78</sup>.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der *in vitro* Charakterisierung der so aussichtsvollen nicht-hämatopoetischen Zellen. Denn es ist noch immer kein eindeutiges Kriterium für die Identifizierung der hMSC gefunden worden. Es gibt noch keinen spezifischen Parameter, wie es die Expression der Oberflächenmarker CD34 oder CD133 für die HSC sind<sup>79</sup>. HMSC werden bis heute über ihre Plastikadhärenz definiert<sup>80,30</sup>, im Gegensatz zu den hHSC, die nicht plastik-adhären sind.

Die FACS Analyse bezüglich der Expression der Oberflächenmarker ergab für die Zellen der drei unterschiedlichen Ursprünge relativ ähnliche Ergebnisse. Alle drei waren negativ für die hämatopoetischen Marker CD34 und CD45 ( $8 \pm 1,3\%$ ). Alle drei waren positiv für das  $\beta$ 1-Integrin CD29, für das Adhäsionsmolekül CD44, für den Stromazellmarker CD73, für CD90, welcher auch auf hHSC zu finden ist und für Endoglin = CD105, ein Marker für Endothel- und Stromazellen. Diese Ergebnisse korrelieren mit denen anderer Arbeitsgruppen<sup>40, 80, 81, 82</sup>.

Um eine Aussage über die Kultivierbarkeit und damit auch spätere klinische Anwendbarkeit machen zu können, wurde das Wachstum der hMSC aus Knochenmark, Fettgewebe und Nabelschnurblut verglichen. Aus den Ergebnissen (Abb. 3.5) ist zu schließen, dass neben dem oft verwendeten Knochenmark das Fettgewebe eine gute Alternative zur Stammzellgewinnung bietet<sup>83</sup>. Neben der vergleichbaren Beschaffenheit der Oberflächenantigenexpression<sup>84,85</sup> zeigen die hMSC aus dem Fettgewebe auch ein ähnlich schnelles Wachstum und damit eine entsprechend einfache Kultivierung. Die hMSC aus Nabelschnurblut weisen hier zu Anfang Defizite auf. In den ersten 2 Wochen ist eine deutliche Wachstumsverzögerung zu sehen, was die *in vitro* Kultivierung erschwert. In der dritten Woche proliferieren die hMSC aus Nabelschnurblut hingegen deutlich schneller als die Vergleichsgruppen.

Die gleiche Wachstumsanalyse wurde ebenfalls bei Kultivierung in hypoxischer Umgebung ( $<5\% \text{ O}_2$ ) durchgeführt, da dies vermutlich die physiologische Umgebung in den Nischen der hMSC ist<sup>86</sup>. Schon vor 15 Jahren beschrieb eine Studie, dass Stammzellen physiologisch in hypoxischen Nischen zu finden waren<sup>87</sup> und dass die Veränderung des Sauerstoffgehaltes die weitere Entwicklung beeinflusst<sup>88</sup>. Die Abbildungen 3.6, 3.7 und 3.8 zeigen im direkten Vergleich das Wachstum der hMSC aus BM, PLA und CB in normoxischer und hypoxischer Kultivierung. Bei allen Zelltypen ist ein Nutzen des niedrigen Sauerstoffgehaltes zu erkennen. Beim BM ist der Vorteil nicht so deutlich zu erkennen wie beim PLA und CB. Beim CB ist er sogar dadurch zu erkennen, dass in normoxischer Umgebung nach drei Wochen kaum noch Zellen zur Messung da waren, trotz dem die Kultivierung und Messung immer parallel lief. Daraus ist zu schließen, dass die hypoxischen Bedingungen einen nutzbringenden Effekt haben. 2005 beschrieb dies eine Arbeitsgruppe, die MSC mit dem Gen des Wachstumsfaktors FGF-2 für die Behandlung von Herzinfarkt transfizierten. Unter hypoxischen Bedingungen zeigten diese transfizierten Zellen eine bessere Überlebensrate und wiesen zusätzlich günstige Effekte bezüglich des Herzinfarktes auf<sup>89</sup>.

MSC reagieren sehr sensibel auf ihre Umgebung. Im ischämisch geschädigten Herzgewebe herrschen hypoxische und entzündliche Bedingungen, welche die MSC beeinflussen<sup>39</sup>. Verschiedene Arbeitsgruppen fanden heraus, dass die hypoxischen Bedingungen, wie sie in einem „Wundmilieu“ vorherrschend sind, Ursache für eine erhöhte

Produktion an Wachstumsfaktoren sind, welche die Zellproliferation und das Zellüberleben antreiben. Ein wichtiger Vertreter ist hier der „*vascular endothelial growth factor*“ (VEGF), der ein Induktor der Angiogenese und Vaskulogenese ist. Andere Wachstumsfaktoren sind FGF-2, HGF, IGF-1 und PGF<sup>90,91,92</sup>. Mit diesem Anstieg der Wachstumsfaktoren ist die verbesserte Proliferation der MSC unter hypoxischen Bedingungen zu erklären.

Die Beobachtungen in dieser Arbeit und die anderer Studien lassen zu dem Ergebnis kommen, dass die MSC aus Nabelschnurblut vermutlich die besten der drei Zelltypen für die Regeneration am Herzen zu sein scheinen. Sie sind zwar in einer geringeren Frequenz zu isolieren, haben jedoch eine weitaus größere Expansionskapazität als MSC aus BM und PLA<sup>44,93</sup>, was in den Versuchen dieser Arbeit nach 3-wöchiger Beobachtung sehr deutlich wird. Dies ist auf die erhöhte Telomeraseaktivität und –länge der CB-MSC zurückzuführen<sup>94</sup>. Außerdem weisen sie als jüngste Zellgruppe eine hohe Frequenz an unreifen Stamm- und Progenitorzellen auf. Desweiteren haben die CB-MSC genau wie die BM-MSC einen immunsuppressiven Effekt, was das Risiko einer Graft-versus-Host-Erkrankung im Zuge einer Transplantation reduzieren kann<sup>95</sup>. Ein nicht zu verachtender Vorteil der Mesenchymalen Stammzellen aus dem Nabelschnurblut ist außerdem, dass sie aus Material gewonnen werden, das weder künstlich hergestellt werden muss, noch dem Spender schadet, außerdem kann es als kryokonserviertes Produkt lange aufbewahrt werden.

5-Azacytidin ist ein chemisches Analogon des Nukleosids Cytidin und wird in der heutigen Medizin als Zytostatikum eingesetzt. Es wird während der Replikation in die DNA und während der Transkription in die RNA eingesetzt und hemmt somit die Methyltransferasen, was eine Demethylierung zur Folge hat. Dadurch wird die Zellregulation beeinflusst. Der genaue Wirkmechanismus der Differenzierung von MSC zu kardiomyozyten-ähnlichen Zellen durch 5-Azacytidin ist zurzeit noch unklar. Man vermutet jedoch eine Regulation der Expression von sog. stillen Genen<sup>96</sup>. Die Arbeitsgruppe um Ye analysierte 2006 die MSC des Knochenmarks von Schweinen und fand heraus, dass die Proteine, welche die Zellproliferation und die Differenzierung steuern, wie zum Beispiel *alpha B-crystallin*, *annexin A2* und *stathmin 1*, vermehrt exprimiert wurden<sup>97</sup>.

Über die Auswirkung von 5-Azacytidin als Präkonditionierung und zur Induktion von kardiomyogener Differenzierung gibt es in der Forschung geteilte Meinungen.

Bereits 1999 widmeten sich Arbeitsgruppen der Frage über die Wirkung von 5-Azacytidin. Tomita und Mitarbeiter behandelten MSC aus dem Knochenmark der Ratte für 24Std. mit 10µmol/L 5-Azacytidin und untersuchten diese Zellen *in vitro* und *in vivo*. Die *in vitro* Charakterisierung ergab ein positives Signal für *Troponin I* und für die

*Myosinschwerketten* in den behandelten Zellen im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen. Dies war ein Beweis dafür, dass die Zellen in herz-ähnliche Muskelzellen differenziert sind. Durch die autologe Transplantation der präkonditionierten Ratten-MSC in die Narbe eines zuvor induzierten Herzinfarktes wurde die Kontraktion des Herzen verbessert und die Angiogenese wurde angeregt<sup>22</sup>. Vergleichbare Ergebnisse erzielte die Forschungsgruppe um Makino im selben Jahr. *In vitro* Beobachtungen ergaben bei 30% der mit 5-Azacytidin behandelten Zellen morphologische Veränderungen. Nach zwei Wochen waren spontane Kontraktionen zu sehen, welche eine weitere Woche später sogar synchron waren. Immunhistochemisch und elektronenmikroskopisch ließen sich ebenso Anzeichen für eine Differenzierung in Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen nachweisen<sup>98</sup>. In den folgenden Jahren belegten noch weitere Arbeitsgruppen diesen Effekt des Cytidin Analogons<sup>99,100</sup>.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Resultate der genannten Arbeitsgruppen zum Teil. Beweisen soll das die molekulargenetische Untersuchung mit den sog. „*Stemness*“ Markern. Dies sind Marker, welche für den undifferenzierten Zustand, also für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz stehen. Die wichtigsten Vertreter, die sich zum Teil gegenseitig beeinflussen, sind *Oct-4 (Pou5f1)* und *Nanog*, welches intrinsische Transkriptionsfaktoren sind, *Wnt-3* und *Rex-1 (Zfp-42)*<sup>101,102</sup>. In der Gelelektrophoretischen Darstellung der cDNA von MSC aus BM und PLA mit und ohne 5-Azacytidin Behandlung (Abb. 3.10 und Diagramm 3.2) wird deutlich, dass die „*Stemness*“ Marker bei den präkonditionierten MSC eine geringere Ausprägung haben. Daraus lässt sich ableiten, dass sie an Pluripotenz verloren und sich differenziert haben.

Auch die Expression der Oberflächenmarker der mit 5-Azacytidin behandelten hMSC und der ohne Behandlung wurde verglichen. Die hämatopoetischen Marker CD34 und CD45, die bei den unbehandelten Zellen schon in sehr geringer Zahl vorhanden waren, haben sich sowohl bei den Zellen aus BM als auch bei denen aus PLA noch weiter verringert, was auf eine Entwicklung hindeutet<sup>40</sup>. Auffällig ist in beiden Proben, BM und PLA, der Anstieg des Markers CD105. CD105 = SH3 oder *Endoglin* ist auf der Oberfläche von Endothelzellen zu finden und ist verantwortlich für die Entwicklung des Kardiovaskulären Systems und für die Gefäßneubildung. Seine Expression ist durch die Entwicklung des Herzens gesteuert und durch sein Fehlen kommt es zu kardiovaskulären Anomalien<sup>103</sup>. Eine erhöhte Expression spricht demnach für eine Entwicklung in Richtung einer Endothelzelle.

Ein weiterer Hinweis auf mögliche Differenzierung bietet die Immunfluoreszenzfärbung. Die Färbung des frühen Transkriptionsfaktors im Herzen *MEF-2C* erbrachte ein positives intranukleäres Signal unter dem Konfokalen Laser Rastermikroskop, welches in den unbehandelten Zellen nicht nachzuweisen war. Dieses Resultat deutet auf eine kardiomyozytäre Differenzierung der hMSC hin.

Zusammenfassend sei gesagt, dass die Wirkung des 5-Azacytidins und das Differenzierungspotential der hMSC umstritten bleiben. Einige Arbeitsgruppen weisen diese Differenzierbarkeit nicht nach, obwohl sie vergleichbare Versuchspläne haben<sup>104,105</sup>. Außerdem bleibt zu klären, ob die parakrinen Effekte der Behandlung nicht wichtiger für die funktionelle Erholung des infarzierten Herzens sind als die Transdifferenzierung der Stammzellen.

Die Anwendung des 5-Azacytidins ist definitiv nicht eindeutig zu bewerten, da die Diskrepanz der Forschungsergebnisse bis jetzt nicht erklärbar ist. Es sei nicht zu vergessen, dass 5-Azacytidin in der heutigen medizinischen Anwendung ein systemisch wirkendes Zytostatikum ist und erhebliche Nebenwirkungen auf die Stammzellen im Körper hat.

## 4.2 Differenzierungsmöglichkeiten CD133<sup>+</sup> Knochenmarkstammzellen

Schon 1999 wurde von Tomita und Mitarbeitern in einem Tiermodell die Verbesserung der Herzpumpfunktion durch intramyokardiale Injektion von autologen Knochenmarkstammzellen bewiesen<sup>22</sup>. Die Arbeitsgruppe um Orlic konnte außerdem zeigen, dass die Injektion von c-kit<sup>+</sup>-Knochenmarkstammzellen in die Randzone des noch vitalen Infarktgebiets der Maus nach 9 Tagen zu einer Verbesserung der Regeneration des infarzierten Myokards führte<sup>106,107</sup>.

2002 wurde der erste Bericht von der Arbeitsgruppe um Strauer veröffentlicht, der eine intrakoronare Stammzelltransplantation am Menschen beschreibt<sup>108</sup>. Autologe mononukleäre Knochenmarkszellen wurden während einer Ballondilatation (PTCA, engl. = percutaneous transluminal coronary angioplasty) 10 Patienten, die einen akuten Myokardinfarkt hatten, injiziert. Die Vergleichsgruppe erhielt das Standardprogramm (PTCA) ohne Zellinjektion. Nach 3 Monaten wies die Gruppe mit der Zelltherapie eine signifikante Verkleinerung der Infarktnarbe auf. Außerdem zeigten diese Patienten ein vermehrtes linksventrikuläres end-systolisches Volumen und eine verbesserte Kontraktilität.

Stamm und Mitarbeiter konzentrieren sich auf die autologe Transplantation von selektiven CD133-positiven adulten Knochenmarkstammzellen. Sie injizierten diese in die Infarkttrandzone von 6 Patienten mit länger zurück liegendem Myokardinfarkt im Zuge einer Bypassoperation. Drei bis neun Monate nach der Operation wiesen vier Patienten eine verbesserte linksventrikuläre Funktion auf, bei fünf Patienten war die Durchblutung des infarzierten Gewebes deutlich verbessert. Dies lässt darauf schließen, dass die Implantation von CD133<sup>+</sup> Stammzellen eine Induktion der Angiogenese und eine Verbesserung der Infarktperfusion zur Folge hat<sup>46</sup>. Eine weitere Arbeit aus dem Jahr 2005 beweist den vorteilhaften Effekt der intrakoronaren Injektion von

CD133<sup>+</sup> Stammzellen bei Patienten mit kürzlich erfahrenem Herzinfarkt<sup>109</sup>. Sie fasst die Ergebnisse wie folgt zusammen: (1) Die Injektion von CD133<sup>+</sup> Stammzellen ist möglich; (2) Kein Auftreten von ventrikulären Arrhythmien, wie es bei der Injektion von Skelettmyoblasten ins Myokard wegen fehlender Ausbildung von Gap junctions in der Vergangenheit der Fall war<sup>110,111</sup>; (3) Die CD133<sup>+</sup>-Injektion trägt zur funktionellen Erholung nach Herzinfarkt bei.

Der günstige Einfluss von Stammzellen auf das durch einen Herzinfarkt geschädigte Myokard scheint damit nahezu bewiesen. Es stellt sich nun mehr die Frage nach dem genauen nutzbringenden Mechanismus, welcher durch die *in vitro* Experimente vieler Arbeitsgruppen geklärt werden soll.

Adulte Stammzellen können im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen *in vitro* nicht spontan in Kardiomyozyten differenzieren, sie benötigen eine chemische oder biologische Induktion ihrer Umgebung.

Condorelli und Mitarbeiter beschrieben erstmals 2001 das Modell der Ko-Kultur mit neonatalen Rattenkardiomyozyten<sup>112</sup>. Sie kultivierten diese Zellen mit Endothelzellen der fötalen Aorta der Maus. Sie beobachteten hierbei eine Differenzierung zu Kardiomyozyten bei bis zu 10%. Was sich durch die Kontraktion der Herzzellen und den Nachweis von Herzmarker beweisen lies. Humane endotheliale Progenitorzellen (EPC) aus peripherem Blut wurden in einer anderen Studie mit Rattenkardiomyozyten ko-kultiviert<sup>113</sup>. Mit Hilfe des Zell-Zell-Kontaktes durch Gap junction-Kommunikation, jedoch ohne Zellfusion, wiesen die EPC nach sechs Tagen phänotypische und funktionelle Eigenschaften von Kardiomyozyten auf. Desgleichen bewies diese Arbeitsgruppe das Transdifferenzierungspotential von CD34<sup>+</sup>-Stammzellen in einer vergleichbaren Ko-Kultur.

In dieser Arbeit wurden humane CD133<sup>+</sup>-Stammzellen mit einer stabilen Skelettmyoblastenzelllinie der Maus (C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>) ko-kultiviert. Die CD133<sup>+</sup>-Stammzellen sind eine Subpopulation der CD34<sup>+</sup>-Stammzellen, welchen kardioprotektive Eigenschaften nachgesagt werden<sup>23</sup>. Mehr als 80% der CD34<sup>+</sup> sind auch CD133-positiv. Das Genexpressionsprofil der beiden Stammzellenpopulationen CD34<sup>+</sup> und CD133<sup>+</sup> deutet an, dass CD133<sup>+</sup> die unreiferen Stammzellen sind und somit geeigneter für die Stammzellexpansion und Gentherapie scheinen<sup>114</sup>. Skelettmyoblasten gelten ebenfalls als potentielle Myokardregeneratoren, wie Studien an anderen Spezies zeigen<sup>16,115,15,116</sup>. Obgleich die Myoblasten von der Skelettmuskulatur stammen, haben Studien bewiesen, dass sie in der Lage sind, Glanzstreifen (Disci intercalati) im Herzen zu bilden und eine lose Verbindung zum übrigen Herzmuskelgewebe einzugehen<sup>117,118</sup>. Klinische Arbeiten haben dies bewiesen<sup>119</sup>. Hierbei gibt es jedoch Probleme, da ge-



häuft ventrikuläre Rhythmusstörungen aufgetreten sind. Es wird empfohlen, die Implantation von Skelettmyoblasten nur unter dem Schutz eines AICD (= automatischer implantierter Cardioverter/Defibrillator) durchzuführen.

Die Ko-Kultur wurde nach 14 Tagen immunhistologisch untersucht. Die Färbung des Transkriptionsfaktors *MEF-2C*, welcher ein früher Marker ist, zeigte ein positives intranukleäres Signal (Abb. 3.11 A). Diese Zelle zeigt ebenfalls ein positives intranukleäres Signal für den humanen Antikörper auf (Abb. 3.11 B), was ein Hinweis für die Transdifferenzierung der CD133-positiven Stammzelle in eine Kardiomyozyten-ähnliche Zelle ist. Wie auch schon in anderen Studien belegt<sup>120</sup>, ist die Zellfusion hier nicht der ausschlaggebende Mechanismus, was gegen die Auffassung der Arbeitsgruppe um Reinecke spricht, welche  $C_2C_{12}$  als von Natur aus „fusigen“ bezeichnet und sich für eine Fusion der Zellen bei einer Ko-Kultur ausspricht<sup>121</sup>. Die  $C_2C_{12}$ -Reinkultur als Negativkontrolle demonstriert, dass hier keine Spontandifferenzierung vorliegt (Abb. 3.11 E+F).

Die Immunofärbung des *Troponin I*, das ein später Marker ist, zeigte sowohl in der Reinkultur als auch in der Ko-Kultur ein positives Signal, eine Kernfärbung mit dem menschlichen Antikörper fehlte in beiden Kulturen. Dies lässt darauf schließen, dass es sich hierbei nicht um eine differenzierte Zelle handelt, sondern wahrscheinlich um eine veränderte Skelettmyoblastenzelle der Maus. Da Troponin in allen Muskelzellen zu finden ist, scheint der Antikörper nicht spezifisch zu sein.

Die Analyse auf molekulargenetischer Ebene mittels RT-PCR zeigt vergleichbare Ergebnisse (Abb. 3.12), was schon bei der Gegenüberstellung der spezifischen Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenasen (GAPDH) deutlich wird. Die Ko-Kultur zeigt einen geringen aber sichtbaren Anteil menschlicher Zellen (hGAPDH) und einen deutlichen Anteil der Zellen der Maus (mrGAPDH). Dies ist zum einen auf das Mischungsverhältnis der Zellen zu Beginn zurückzuführen, zum anderen auf die hohe Proliferationsrate der Myoblasten. Außerdem spiegelt es die Tatsache wider, dass der größte Anteil der Zellen nicht-differenzierte Zellen sind. Der menschliche Herzmarker *hGATA-4a*, welcher sich früh in der Kardiomyogenese entwickelt, zeigt ein sehr schwaches, also zweifelhaftes Signal. In dieser Probe scheinen sehr wenige, bis gar keine Zellen differenziert zu sein. *hNkx 2.5* ist ebenfalls ein früher Herzmarker. Dieser zeigt eine positive Bande, ebenso wie das *Troponin T2*. Dies sind Hinweise auf eine Transdifferenzierung der humanen CD133<sup>+</sup>-Knochenmarkstammzellen zu Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen.

Das Live-Cell-Imaging neonataler Kardiomyozyten wurde zum Zwecke einer Positivkontrolle für die Ko-Kultur erstellt. Man kann mit ihr die Unterschiede einer sich kontrahierenden Zelle gegenüber einer nicht kontrahierenden Zelle klar sichtbar machen. Da sich die Zellen der Kultur jedoch nicht kontrahiert haben, ist dieses Verfahren nicht zum Einsatz gekommen.

Dass der Großteil der Ko-Kultur Versuche keine Zeichen der Differenzierung zeigte, wirft die Frage auf, ob eine Transdifferenzierung überhaupt möglich ist. Diese Fragestellung ist noch immer Thema heftiger Diskussionen. So publizierten 2004 zwei Arbeitsgruppen in der britischen Fachzeitschrift „Nature“, dass hämatopoetische Zellen nicht in der Lage sind, zu Muskelzellen zu differenzieren<sup>15,122</sup>. Die Arbeitsgruppe um Balsam beschrieb einen vergleichbaren Versuch, wie es Orlic und Mitarbeiter 2001 taten, in welchem sie behaupteten, dass Stammzellen zu einem kleinen Prozentsatz „de-novo-Myokardium“ erzeugen können<sup>106</sup>. Balsams Forschergruppe fand jedoch heraus, dass sich adulte Knochenmarkstammzellen keineswegs transdifferenzieren, sondern lediglich ihren traditionellen hämatopoetischen Differenzierungsweg einschlagen und zur Potenzierung der angiogenetischen Aktivität beitragen. Zusätzlich ergaben die Studien, dass nach 30 Tagen nur noch  $0,2 \pm 0,2\%$  der injizierten Stammzellen nachzuweisen waren<sup>122</sup>.

Zusammenfassend ist folglich festzuhalten, dass die verbesserte myokardiale Pumpfunktion scheinbar zu einem kleineren Anteil auf die de-novo Genese durch kardio-myozytäre Differenzierung der Knochenmarkstammzellen zurückzuführen ist.

Ein weiterer Ansatz zur Erläuterung des günstigen Effekts der HSC ist auf das endotheliale Differenzierungspotential dieser Zellen zurückzuführen. Die CD133<sup>+</sup> und CD34<sup>+</sup> Knochenmarkstammzellen sind als Vorläufer von Endothelialen Progenitorzellen (EPC) identifiziert worden und können *in vitro* zu endothelialen Zellen differenzieren, indem sie mit dem Wachstumsfaktor *VEGF* stimuliert werden<sup>123,124,125</sup>. *In vivo* induziert die Hypoxie die vermehrte Ausschüttung der Wachstumsfaktoren. Die Vaskulogenese der EPC beginnt mit der Mobilisierung aus dem Knochenmark und der Chemotaxis. Die zirkulierenden EPC werden dann durch die erhöhten Wachstumsfaktoren wie *VEGF* und *SDF-1* („stromal-cell derived factor-1“) attrahiert<sup>126,127,128,129,130</sup>. Darauf folgen die Adhäsion, die transendotheliale Migration und die Invasion in das ischämische Gewebe. Dort proliferieren und differenzieren die Zellen, die über ähnliche Funktion wie embryonale Angioblasten verfügen.

Es bleibt also weiterhin zu untersuchen, ob der nutzbringende Effekt für das ischämisch geschädigte Myokard dem vaskulogenetischen und angiogenetischen<sup>23</sup> oder dem myokardialen Potential zu verdanken ist oder ob andere pathophysiologische Mechanismen Grund für die positiven Resultate bei der klinischen Behandlung mit Knochenmarkstammzellen sind.

Abschließend ist zu sagen, dass es zweifelsfrei überzeugende Beweise gibt, die für das Potential adulter humaner Stammzellen sprechen, Myokard zu regenerieren, Neovaskularisation zu induzieren und die Funktion des Herzen zu verbessern. Die Frage, welche der Stammzellen die optimale Zellpopulation für die regenerative Medizin ist



---

oder ob es sogar die Kombination aus zwei Zelltypen ist <sup>131</sup>, bleibt noch zu klären. Festzuhalten ist, dass diese Stammzellen ein kardiomyozytäres Potential besitzen, welches unter Umständen hinsichtlich einer Präkonditionierung nützlich sein könnte. Die Kardiomyozytogenese-Kette kann durch spezielle Faktoren induziert werden, spezifischer als die Behandlung mit 5-Azacytidine. Ein aktueller Marker der kardiomyozytären Morphogenese ist MesP1, welcher aktuell von der Forschungsgruppe um Franz untersucht wird<sup>132</sup>. MesP1 spielt eine Schlüsselrolle in der frühen kardiovaskulären Determinierung. Eine Überexpression dieses Transkriptionsfaktors könnte die adulten Stammzellen somit in ihrem kardiomyozytären Differenzierungsweg beeinflussen. Zukünftige Forschungen müssen außerdem die bestmögliche Zellanzahl und den idealen Applikationsweg herausfinden, bis sich die Stammzelltherapie in der klinischen Medizin endgültig etablieren kann.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Der akute Myokardinfarkt und seine Folgen stellen nach wie vor die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen dar. Die Stammzelltherapie rückt dabei immer näher in das Spektrum der interessanten und sinnvollen Therapiemethoden, da ihre nutzbringende Wirkung bereits bewiesen ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die pathophysiologischen Mechanismen des aussichtsreichen Effekts der Stammzelltherapie im Bereich der Myokardregeneration *in vitro* untersucht.

Humane extrakardiale Mesenchymale Stammzellen (hMSC) aus Nabelschnurblut haben sich in verschiedenen Wachstumsvergleichen als besser im Gegensatz zu den MSC aus Knochenmark und Fettgewebe herausgestellt. Das kardiomyozytäre Differenzierungspotential der hMSC wurde nach einer zweiwöchigen 5-Azacytidin Behandlung der Zellen auf zwei Ebenen nachgewiesen. Auf Proteinebene bewies die Expression des kardiomyozytären Transkriptionsfaktors *MEF-2C* in der behandelten Zellkultur Veränderungen. Auf genetischer Ebene wurde bei den behandelten Zellen eine schwächere Ausprägung der sog. *Stemnessmarker*, wie z.B. *Nanog* oder *Rex-1* nachgewiesen, was für eine Abnahme der Pluripotenz und somit für eine Differenzierung spricht. Eine Beweisführung auf funktioneller Ebene muss in weiteren Studien erfolgen. Die Frage bleibt dennoch, ob die positiven Effekte auf das verletzte Myokard auf die Differenzierung oder auf andere parakrine Effekte zurückzuführen sind.

Humane Knochenmarkstammzellen, welche das Oberflächenantigen CD133 tragen, wurden im Zuge einer zweiwöchigen Ko-Kultivierung mit Maus-Skelett-Myoblasten (C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>) auf ihre Transdifferenzierung in kardiomyozyten-ähnlichen Zellen untersucht. Hierbei wurden zum ersten Mal für CD133-positive Knochenmarkstammzellen nachgewiesen, dass sie in einer Ko-Kultur mit Maus-Skelett-Myoblasten human-spezifische Herz-Marker ausbilden, was auf eine kardiomyozytäre Differenzierung hinweist. Die Ergebnisse basieren sowohl auf Gen- als auch auf Proteinexpression in einer bis jetzt noch relativ geringen Quantität. Der Aspekt der Fusion wurde hierbei durch eine Doppelfärbung ausgeschlossen.

Sowohl Mesenchymale Stammzellen als auch Knochenmarkstammzellen weisen trotz ihrer unterschiedlichen Charakteristika beide ein kardiomyozytäres Differenzierungspotential auf, was mit der Expression von verschiedenen Herz-spezifischen Genen und Proteinen nach gewiesen wurde. Ausgehend davon ist die funktionelle Integration ins Myokard in weiteren Untersuchungen zu überprüfen.

Wenn die Quantität der kardiomyozytären Differenzierung dieser extrakardialen adulten Stammzellen zusätzlich zu den parakrinen Effekten und dem angiogenetisch/vaskulogenetischen Potential der Zellen erhöht wird, so kann eine weitere Nutzbarkeit für die regenerative Therapie in Aussicht gestellt werden und das therapeutische Spektrum auf dem Gebiet erweitert werden.

## LITERATURVERZEICHNIS

- <sup>1</sup> **Statistisches Bundesamt Deutschland**, Wiesbaden, Pressemitteilung 385 vom 21.09.2007, [www.destatis.de](http://www.destatis.de)
- <sup>2</sup> **Oeppen J, Vaupel JW.**  
Demography. Broken limits to life expectancy.  
Science. 2002 May 10;296(5570):1029-31.
- <sup>3</sup> **Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P.**  
Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration.  
Cell. 2003 Sep 19;114(6):763-76.
- <sup>4</sup> **MacLellan WR, Schneider MD.**  
Genetic dissection of cardiac growth control pathways.  
Annu Rev Physiol. 2000;62:289-319. Review.
- <sup>5</sup> **Anversa P, Nadal-Ginard B.**  
Myocyte renewal and ventricular remodelling.  
Nature. 2002 Jan 10;415(6868):240-3. Review.
- <sup>6</sup> **Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P.**  
Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction.  
N Engl J Med. 2001 Jun 7;344(23):1750-7.
- <sup>7</sup> **Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P.**  
Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jul 21;95(15):8801-5.
- <sup>8</sup> **Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA.**  
Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells.  
J Clin Invest. 2001 Jun;107(11):1395-402.
- <sup>9</sup> **Deb A, Wang S, Skelding KA, Miller D, Simper D, Caplice NM.**  
Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients.  
Circulation. 2003 Mar 11;107(9):1247-9.
- <sup>10</sup> **„Innere Medizin“** Gerd Herold, 2007
- <sup>11</sup> **Schwarz F, Schuler G, Katus H, Hofmann M, Manthey J, Tillmanns H, Mehmel HC, Kübler W.**  
Intracoronary thrombolysis in acute myocardial infarction: duration of ischemia as a major determinant of late results after recanalization.  
Am J Cardiol. 1982 Nov;50(5):933-7.
- <sup>12</sup> **„Psychoembel“** Klinisches Wörterbuch, 259. Auflage

<sup>13</sup> **Leor J, Patterson M, Quinones MJ, Kedes LH, Kloner RA.**

Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium?

Circulation. 1996 Nov 1;94(9 Suppl):II332-6.

<sup>14</sup> **Min JY, Yang Y, Sullivan MF, Ke Q, Converso KL, Chen Y, Morgan JP, Xiao YF.**

Long-term improvement of cardiac function in rats after infarction by transplantation of embryonic stem cells.

J Thorac Cardiovasc Surg. 2003 Feb;125(2):361-9.

<sup>15</sup> **Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD.**

Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis.

J Clin Invest. 1996 Dec 1;98(11):2512-23.

<sup>16</sup> **Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA, Glower DD, Kraus WE.**

Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation.

Nat Med. 1998 Aug;4(8):929-33. Erratum in: Nat Med 1998 Oct;4(10):1200.

<sup>17</sup> **Jia ZQ, Mickle DA, Weisel RD, Mohabeer MK, Merante F, Rao V, Li G, Li RK.**

Transplanted cardiomyocytes survive in scar tissue and improve heart function.

Transplant Proc. 1997 Jun;29(4):2093-4.

<sup>18</sup> **Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Zhang J, Mohabeer MK, Rao V, Ivanov J.**

Cardiomyocyte transplantation improves heart function.

Ann Thorac Surg. 1996 Sep;62(3):654-60; discussion 660-1.

<sup>19</sup> **Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Merante F, Mickle DA.**

Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function.

J Mol Cell Cardiol. 1999 Mar;31(3):513-22.

<sup>20</sup> **Yoo KJ, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Li G, Yau TM.**

Autologous smooth muscle cell transplantation improved heart function in dilated cardiomyopathy.

Ann Thorac Surg. 2000 Sep;70(3):859-65.

<sup>21</sup> **Leri A, Kajstura J, Anversa P.**

Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration.

Physiol Rev. 2005 Oct;85(4):1373-416. Review.

<sup>22</sup> **Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, Jia ZQ.**

Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function.

Circulation. 1999 Nov 9;100(19 Suppl):II247-56.

<sup>23</sup> **Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S.**

Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function.

Nat Med. 2001 Apr;7(4):430-6.

<sup>24</sup> **Cai J, Yi FF, Yang XC, Lin GS, Jiang H, Wang T, Xia Z.**

Transplantation of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves cardiac function in infarcted rat hearts.

Cytotherapy. 2007;9(3):283-91.

- <sup>25</sup> **Menasché P, Hagège AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP, Duboc D.**  
Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Apr 2;41(7):1078-83.
- <sup>26</sup> **Koestenbauer S, Zech NH, Dohr G.**  
Trans-Differenzierung von adulten Stammzellen – Ist eine Veränderung in Richtung naiver Zellen möglich?  
*Reproduktionsmed Endokrinol* 2006; 3 (5): 324-30.
- <sup>27</sup> **Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS.**  
The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells.  
*Cell Tissue Kinet.* 1970 Oct;3(4):393-403.
- <sup>28</sup> **Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, Ruadkow IA.**  
Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method.  
*Exp Hematol.* 1974;2(2):83-92.
- <sup>29</sup> **Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV.**  
Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo.  
*Transplantation.* 1974 Apr;17(4):331-40.
- <sup>30</sup> **Muraglia A, Cancedda R, Quarto R.**  
Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model.  
*J Cell Sci.* 2000 Apr;113 ( Pt 7):1161-6.
- <sup>31</sup> **Gimble J, Guilak F.**  
Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential.  
*Cytotherapy.* 2003;5(5):362-9. Review.
- <sup>32</sup> **Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K.**  
Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential.  
*Stem Cells.* 2004;22(5):649-58.
- <sup>33</sup> **Erices A, Conget P, Minguell JJ.**  
Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood.  
*Br J Haematol.* 2000 Apr;109(1):235-42.
- <sup>34</sup> **Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR.**  
Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.  
*Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
- <sup>35</sup> **Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ.**  
Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 May 23;92(11):4857-61.

<sup>36</sup> **Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, Chopp M.**

Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats.

Stroke. 2001 Apr;32(4):1005-11.

<sup>37</sup> **Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F.**

Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors.

Science. 1998 Mar 6;279(5356):1528-30. Erratum in: Science 1998 Aug 14;281(5379):923.

<sup>38</sup> **Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S.**

Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro.

J Clin Invest. 1999 Mar;103(5):697-705.

<sup>39</sup> **Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD.**

Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart.

Circulation. 2002 Jan 1;105(1):93-8.

<sup>40</sup> **Pittenger MF, Martin BJ.**

Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics.

Circ Res. 2004 Jul 9;95(1):9-20. Review.

<sup>41</sup> **Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O.**

HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells.

Exp Hematol. 2003 Oct;31(10):890-6.

<sup>42</sup> **Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noël D, Jorgensen C.**

Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals.

Blood. 2003 Nov 15;102(10):3837-44. Epub 2003 Jul 24.

<sup>43</sup> **Prockop DJ.**

Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues.

Science. 1997 Apr 4;276(5309):71-4. Review.

<sup>44</sup> **Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K.**

Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue.

Stem Cells. 2006 May;24(5):1294-301. Epub 2006 Jan 12.

<sup>45</sup> **Sottile V, Halleux C, Bassilana F, Keller H, Seuwen K.**

Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells.

Bone. 2002 May;30(5):699-704.

<sup>46</sup> **Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schümichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G.**

Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration.

Lancet. 2003 Jan 4;361(9351):45-6.

<sup>47</sup> **Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganzer A, Drexler H.**

Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial.

Lancet. 2004 Jul 10-16;364(9429):141-8.

<sup>48</sup> **Zhang M, Methot D, Poppa V, Fujio Y, Walsh K, Murry CE.**

Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies.

J Mol Cell Cardiol. 2001 May;33(5):907-21.

<sup>49</sup> **Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Delilieri GL.**

Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells.

Br J Haematol. 2001 Oct;115(1):186-94.

<sup>50</sup> **Bhatia M.**

AC133 expression in human stem cells.

Leukemia. 2001 Nov;15(11):1685-8. Review.

<sup>51</sup> **Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM.**

Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow.

J Clin Invest. 2002 Feb;109(3):337-46.

<sup>52</sup> **Kuçi S, Wessels JT, Bühring HJ, Schilbach K, Schumm M, Seitz G, Löffler J, Bader P, Schlegel PG, Niethammer D, Handgretinger R.**

Identification of a novel class of human adherent CD34- stem cells that give rise to SCID-repopulating cells.

Blood. 2003 Feb 1;101(3):869-76. Epub 2002 Sep 19.

<sup>53</sup> **Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC.**

Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation.

Nature. 1999 Sep 23;401(6751):390-4.

<sup>54</sup> **Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP.**

Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells.

Science. 1999 May 14;284(5417):1168-70.

<sup>55</sup> **Bhatia M, Wang JC, Kapp U, Bonnet D, Dick JE.**

Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 May 13;94(10):5320-5.

<sup>56</sup> **Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M.**

Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo.

Nat Med. 2000 Nov;6(11):1229-34.

<sup>57</sup> **Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR.**

Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow.

Science. 2000 Dec 1;290(5497):1779-82.



<sup>58</sup> **Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW.**

Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion.  
Nature. 2002 Apr 4;416(6880):542-5. Epub 2002 Mar 13.

<sup>59</sup> **Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG.**

Changing potency by spontaneous fusion.  
Nature. 2002 Apr 4;416(6880):545-8. Epub 2002 Mar 13.

<sup>60</sup> **Prockop DJ, Olson SD.**

Clinical trials with adult stem/progenitor cells for tissue repair: let's not overlook some essential precautions.  
Blood. 2007 Apr 15;109(8):3147-51. Epub 2006 Dec 14. Review.

<sup>61</sup> **Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N.**

Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.  
Science. 1985 Dec 20;230(4732):1350-4.

<sup>62</sup> **Iwasaki H, Kawamoto A, Ishikawa M, Oyamada A, Nakamori S, Nishimura H, Sadamoto K, Horii M, Matsumoto T, Murasawa S, Shibata T, Suehiro S, Asahara T.**

Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction.  
Circulation. 2006 Mar 14;113(10):1311-25.

<sup>63</sup> **Gee KR, Brown KA, Chen WN, Bishop-Stewart J, Gray D, Johnson I.**

Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes.  
Cell Calcium. 2000 Feb;27(2):97-106.

<sup>64</sup> **Plank DM, Sussman MA.**

Intracellular Ca<sup>2+</sup> measurements in live cells by rapid line scan confocal microscopy: simplified calibration methodology.  
Methods Cell Sci. 2003;25(3-4):123-33.

<sup>65</sup> **Köpp, Dirke und Winkelkemper, Stefanie (2008): „Dilemma Stammzellforschung“.** In: Rheinische Post, 14.02.2008, S. A5

<sup>66</sup> **Hentze H, Graichen R, Colman A.**

Cell therapy and the safety of embryonic stem cell-derived grafts.  
Trends Biotechnol. 2007 Jan;25(1):24-32. Epub 2006 Nov 3. Review.

<sup>67</sup> **Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM.**

Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.  
Science. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7. Erratum in: Science 1998 Dec 4;282(5395):1827.

<sup>68</sup> **van Laake LW, Hassink R, Doevendans PA, Mummery C.**

Heart repair and stem cells.  
J Physiol. 2006 Dec 1;577(Pt 2):467-78. Epub 2006 Sep 28. Review.

<sup>69</sup> **Djouad F, Mrugala D, Noël D, Jorgensen C.**

Engineered mesenchymal stem cells for cartilage repair.

Regen Med. 2006 Jul;1(4):529-37. Review.

<sup>70</sup> **Levicar N, Dimarakis I, Flores C, Tracey J, Gordon MY, Habib NA.**

Stem cells as a treatment for chronic liver disease and diabetes.

Handb Exp Pharmacol. 2007;(180):243-62. Review.

<sup>71</sup> **Trzaska KA, Rameshwar P.**

Current advances in the treatment of Parkinson's disease with stem cells.

Curr Neurovasc Res. 2007 May;4(2):99-109. Review.

<sup>72</sup> **Lee JH, Kosinski PA, Kemp DM.**

Contribution of human bone marrow stem cells to individual skeletal myotubes followed by myogenic gene activation.

Exp Cell Res. 2005 Jul 1;307(1):174-82. Epub 2005 Apr 8.

<sup>73</sup> **Torrente Y, Belicchi M, Sampaolesi M, Pisati F, Meregalli M, D'Antona G, Tonlorenzi R, Porretti L, Gavina M, Mamchaoui K, Pellegrino MA, Furling D, Mouly V, Butler-Browne GS, Bottinelli R, Cossu G, Bresolin N.**

Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle.

J Clin Invest. 2004 Jul;114(2):182-95.

<sup>74</sup> **Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN.**

Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs.

Exp Hematol. 1976 Sep;4(5):267-74.

<sup>75</sup> **Prockop DJ.**

Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues.

Science. 1997 Apr 4;276(5309):71-4. Review.

<sup>76</sup> **Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, Dzau VJ.**

Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts.

Nat Med. 2003 Sep;9(9):1195-201. Epub 2003 Aug 10.

<sup>77</sup> **Berry MF, Engler AJ, Woo YJ, Pirolli TJ, Bish LT, Jayasankar V, Morine KJ, Gardner TJ, Discher DE, Sweeney HL.**

Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006 Jun;290(6):H2196-203. Epub 2006 Feb 10.

<sup>78</sup> **Schuleri KH, Boyle AJ, Hare JM.**

Mesenchymal stem cells for cardiac regenerative therapy.

Handb Exp Pharmacol. 2007;(180):195-218. Review.

<sup>79</sup> **Morrison SJ, Weissman IL.**

The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype.

Immunity. 1994 Nov;1(8):661-73.

<sup>80</sup> **Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW.**

Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging.  
Exp Hematol. 2004 May;32(5):414-25. Review.

<sup>81</sup> **Tocci A, Forte L.**

Mesenchymal stem cell: use and perspectives.  
Hematol J. 2003;4(2):92-6. Review.

<sup>82</sup> **Deans RJ, Moseley AB.**

Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses.  
Exp Hematol. 2000 Aug;28(8):875-84. Review.

<sup>83</sup> **Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH.**

Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.  
Tissue Eng. 2001 Apr;7(2):211-28.

<sup>84</sup> **Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH.**

Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.  
Mol Biol Cell. 2002 Dec;13(12):4279-95.

<sup>85</sup> **Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM.**

Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells.  
J Cell Physiol. 2001 Oct;189(1):54-63.

<sup>86</sup> **Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R, Bunnell B, Ma T.**

Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs.  
J Cell Physiol. 2006 May;207(2):331-9.

<sup>87</sup> **Cipolleschi MG, Dello Sbarba P, Olivetto M.**

The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells.  
Blood. 1993 Oct 1;82(7):2031-7.

<sup>88</sup> **Ivanovic Z, Belloc F, Faucher JL, Cipolleschi MG, Praloran V, Dello Sbarba P.**

Hypoxia maintains and interleukin-3 reduces the pre-colony-forming cell potential of dividing CD34(+) murine bone marrow cells.  
Exp Hematol. 2002 Jan;30(1):67-73.

<sup>89</sup> **Song H, Kwon K, Lim S, Kang SM, Ko YG, Xu Z, Chung JH, Kim BS, Lee H, Joung B, Park S, Choi D, Jang Y, Chung NS, Yoo KJ, Hwang KC.**

Transfection of mesenchymal stem cells with the FGF-2 gene improves their survival under hypoxic conditions.  
Mol Cells. 2005 Jun 30;19(3):402-7.

<sup>90</sup> **Crisostomo PR, Wang Y, Markel TA, Wang M, Lahm T, Meldrum DR.**

Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF-alpha, LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF kappa B- but not JNK-dependent mechanism.  
Am J Physiol Cell Physiol. 2008 Mar;294(3):C675-82. Epub 2008 Jan 30.

<sup>91</sup> **Ohnishi S, Yasuda T, Kitamura S, Nagaya N.**

Effect of hypoxia on gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mononuclear cells.

Stem Cells. 2007 May;25(5):1166-77. Epub 2007 Feb 8.

<sup>92</sup> **Okuyama H, Krishnamachary B, Zhou YF, Nagasawa H, Bosch-Marce M, Semenza GL.**

Expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 in bone marrow-derived mesenchymal cells is dependent on hypoxia-inducible factor 1.

J Biol Chem. 2006 Jun 2;281(22):15554-63. Epub 2006 Mar 30.

<sup>93</sup> **Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, Bogucki BD, Quinn CO, Wall DA.**

Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers.

Biol Blood Marrow Transplant. 2001;7(11):581-8.

<sup>94</sup> **Chang YJ, Shih DT, Tseng CP, Hsieh TB, Lee DC, Hwang SM.**

Disparate mesenchyme-lineage tendencies in mesenchymal stem cells from human bone marrow and umbilical cord blood.

Stem Cells. 2006 Mar;24(3):679-85. Epub 2005 Sep 22.

<sup>95</sup> **Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, Ringdén O.**

Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells.

Lancet. 2004 May 1;363(9419):1439-41.

<sup>96</sup> **Choi SC, Yoon J, Shim WJ, Ro YM, Lim DS.**

5-azacytidine induces cardiac differentiation of P19 embryonic stem cells.

Exp Mol Med. 2004 Dec 31;36(6):515-23.

<sup>97</sup> **Ye NS, Zhang RL, Zhao YF, Feng X, Wang YM, Luo GA.**

Effect of 5-azacytidine on the protein expression of porcine bone marrow mesenchymal stem cells in vitro.

Genomics Proteomics Bioinformatics. 2006 Feb;4(1):18-25.

<sup>98</sup> **Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S.**

Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro.

J Clin Invest. 1999 Mar;103(5):697-705.

<sup>99</sup> **Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, Zhou H, Chen Y.**

Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro.

Exp Biol Med (Maywood). 2004 Jul;229(7):623-31.

<sup>100</sup> **Antonitsis P, Ioannidou-Papagiannaki E, Kaidoglou A, Charokopos N, Kalogeridis A, Kouzi-Koliakou K, Kyriakopoulou I, Klonizakis I, Papakonstantinou C.**

Cardiomyogenic potential of human adult bone marrow mesenchymal stem cells in vitro.

Thorac Cardiovasc Surg. 2008 Mar;56(2):77-82.

<sup>101</sup> **Shi W, Wang H, Pan G, Geng Y, Guo Y, Pei D.**

Regulation of the pluripotency marker Rex-1 by Nanog and Sox2.  
J Biol Chem. 2006 Aug 18;281(33):23319-25. Epub 2006 May 21.

<sup>102</sup> **Xiao L, Yuan X, Sharkis SJ.**

Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells.  
Stem Cells. 2006 Jun;24(6):1476-86. Epub 2006 Feb 2.

<sup>103</sup> **Sanz-Rodriguez F, Guerrero-Esteo M, Botella LM, Banville D, Vary CP, Bernab   C.**

Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins.  
J Biol Chem. 2004 Jul 30;279(31):32858-68. Epub 2004 May 17.

<sup>104</sup> **Ramirez ML, McMorrow IM, Sanderson TM, Lancos CJ, Tseng YL, Cooper DK, Dor FJ.**

Lack of cardiac differentiation in c-kit-enriched porcine bone marrow and spleen hematopoietic cell cultures using 5-azacytidine.  
Cells Tissues Organs. 2005;180(4):195-203.

<sup>105</sup> **Liu Y, Song J, Liu W, Wan Y, Chen X, Hu C.**

Growth and differentiation of rat bone marrow stromal cells: does 5-azacytidine trigger their cardiomyogenic differentiation?  
Cardiovasc Res. 2003 May 1;58(2):460-8.

<sup>106</sup> **Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P.**

Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium.  
Nature. 2001 Apr 5;410(6829):701-5.

<sup>107</sup> **Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P.**

Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Aug 28;98(18):10344-9. Epub 2001 Aug 14.

<sup>108</sup> **Strauer BE, Brehm M, Zeus T, K  stering M, Hernandez A, Sorg RV, K  gler G, Wernet P.**

Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans.  
Circulation. 2002 Oct 8;106(15):1913-8.

<sup>109</sup> **Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B, Mansour S, De Bruyne B, De Bondt P, Van Haute I, Lootens N, Heyndrickx G, Wijns W.**

Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety.  
Circulation. 2005 Aug 30;112(9 Suppl):I178-83.

<sup>110</sup> **Menasch   P, Hagg  e AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP.**

Myoblast transplantation for heart failure.  
Lancet. 2001 Jan 27;357(9252):279-80.

- <sup>111</sup> **Leobon B, Garcin I, Menasche P, Vilquin JT, Audinat E, Charpak S.**  
Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jun 24;100(13):7808-11. Epub 2003 Jun 12.
- <sup>112</sup> **Condorelli G, Borello U, De Angelis L, Latronico M, Sirabella D, Coletta M, Galli R, Balconi G, Folienzi A, Frati G, Cusella De Angelis MG, Gioglio L, Amuchastegui S, Adorini L, Naldini L, Vescovi A, Dejana E, Cossu G.**  
Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Sep 11;98(19):10733-8. Epub 2001 Sep 4.
- <sup>113</sup> **Badorff C, Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A, Fleming I, Busse R, Zeiher AM, Dimmeler S.**  
Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes.  
Circulation. 2003 Feb 25;107(7):1024-32.
- <sup>114</sup> **Hemmoranta H, Hautaniemi S, Niemi J, Nicorici D, Laine J, Yli-Harja O, Partanen J, Jaatinen T.**  
Transcriptional profiling reflects shared and unique characters for CD34+ and CD133+ cells.  
Stem Cells Dev. 2006 Dec;15(6):839-51.
- <sup>115</sup> **Chiu RC.**  
Cardiac cell transplantation: the autologous skeletal myoblast implantation for myocardial regeneration.  
Adv Card Surg. 1999;11:69-98. Review.
- <sup>116</sup> **Pouzet B, Vilquin JT, Hagège AA, Scorsin M, Messas E, Fiszman M, Schwartz K, Menasché P.**  
Intramyocardial transplantation of autologous myoblasts: can tissue processing be optimized?  
Circulation. 2000 Nov 7;102(19 Suppl 3):III210-5.
- <sup>117</sup> **Reinecke H, MacDonald GH, Hauschka SD, Murry CE.**  
Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair.  
J Cell Biol. 2000 May 1;149(3):731-40.
- <sup>118</sup> **Reinecke H, Zhang M, Bartosek T, Murry CE.**  
Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts.  
Circulation. 1999 Jul 13;100(2):193-202.
- <sup>119</sup> **Siminiak T, Kalmucki P, Kurpisz M.**  
Autologous skeletal myoblasts for myocardial regeneration.  
J Interv Cardiol. 2004 Dec;17(6):357-65.
- <sup>120</sup> **Murasawa S, Kawamoto A, Horii M, Nakamori S, Asahara T.**  
Niche-dependent translineage commitment of endothelial progenitor cells, not cell fusion in general, into myocardial lineage cells.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 Jul;25(7):1388-94. Epub 2005 Apr 28.
- <sup>121</sup> **Reinecke H, Minami E, Poppa V, Murry CE.**  
Evidence for fusion between cardiac and skeletal muscle cells.  
Circ Res. 2004 Apr 2;94(6):e56-60. Epub 2004 Mar 4.

- <sup>122</sup> **Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC.**  
Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium.  
Nature. 2004 Apr 8;428(6983):668-73. Epub 2004 Mar 21.
- <sup>123</sup> **Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM.**  
Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis.  
Science. 1997 Feb 14;275(5302):964-7.
- <sup>124</sup> **Bhattacharya V, McSweeney PA, Shi Q, Bruno B, Ishida A, Nash R, Storb RF, Sauvage LR, Hammond WP, Wu MH.**  
Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34(+) bone marrow cells.  
Blood. 2000 Jan 15;95(2):581-5.
- <sup>125</sup> **Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schäfer B, Hossfeld DK, Fiedler W.**  
In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells.  
Blood. 2000 May 15;95(10):3106-12.
- <sup>126</sup> **Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T.**  
Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization.  
Nat Med. 1999 Apr;5(4):434-8.
- <sup>127</sup> **Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T.**  
Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction.  
Circulation. 2001 Jun 12;103(23):2776-9.
- <sup>128</sup> **Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himmel H, Rafii S.**  
Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells.  
Circ Res. 2001 Feb 2;88(2):167-74.
- <sup>129</sup> **Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA.**  
Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction.  
N Engl J Med. 2000 Mar 2;342(9):626-33.
- <sup>130</sup> **Pillarisetti K, Gupta SK.**  
Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor-1 (SDF-1): SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction.  
Inflammation. 2001 Oct;25(5):293-300.
- <sup>131</sup> **Ott HC, Bonaros N, Marksteiner R, Wolf D, Margreiter E, Schachner T, Laufer G, Hering S.**  
Combined transplantation of skeletal myoblasts and bone marrow stem cells for myocardial repair in rats.  
Eur J Cardiothorac Surg. 2004 Apr;25(4):627-34.



---

<sup>132</sup> **David R, Brenner C, Stieber J, Schwarz F, Brunner S, Vollmer M, Mentele E, Müller-Höcker J, Kitajima S, Lickert H, Rupp R, Franz WM**

MesP1 drives vertebrate cardiovascular differentiation through Dkk-1-mediated blockade of Wnt-signalling.

Nat Cell Biol. 2008 Mar;10(3):338-45.Epub 2008 Feb 24.

## ANHANG

### Danksagungen

Herzlich danke ich Prof. Dr. med. G. Steinhoff für die Unterstützung und die Bereitstellung des Themas.

Ich danke Dr. phil. Nan Ma für die Leitung des Labors und die Aufsicht meiner Doktorarbeit.

Großen Dank möchte ich Dr. Lee Lee Ong aussprechen, da sie mich während der gesamten Arbeit betreut hat und mir jeder Zeit mit Rat und Tat beiseite stand.

Ich danke dem gesamten Laborteam Dario, Ralf, Margit, Wenzhong und Wei Wei für die nette Atmosphäre und die Hilfsbereitschaft in der Zeit, in der ich dort gearbeitet habe.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und der ganzen Familie, die mich zu jeder Zeit unterstützt und motiviert haben und ohne die ich es im Studium, mit der Doktorarbeit und im Leben nicht bis hierher geschafft hätte.

Auch meinen Freunden möchte ich danken, mit denen ich die Zeit außerhalb des Studiums und der Doktorarbeit erlebt habe und ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre.

**Selbständigkeitserklärung**

Ich erkläre, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig angefertigt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sowie Zitate kenntlich gemacht habe.

Rostock, den 29. Mai 2009

## CURRICULUM VITAE

### ■ Persönliche Daten

Name: Jana Kristina Oldigs

Anschrift: Oldenburger Straße 8  
23617 Stockelsdorf

Email-Adresse: jana.oldigs@web.de

Geburtstag/-ort: 10.02.1984 in Lübeck

Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### ■ Schulbildung

1990 – 1994 Grundschohlo Stockelsdorf  
1994 – 2003 Abitur: Gymnasium am Mühlenberg, Bad Schwartau  
(Abschlussnote: 1,6)

### ■ Studium

10/2003 – 11/2009 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock

September 2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 2,0

November 2009 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 2,0

### **Praktisches Jahr**

1. Tertial: Innere Medizin am Tygerberg Hospital, University of Stellenbosch, Südafrika.
2. Tertial: Chirurgie am Regionalspital Leuggern, ASANA Gruppe, Leuggern, Schweiz
3. Tertial: Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde an der Universität Rostock

**Famulaturen**

Allgemein-, Viszeral-, Thoraxchirurgie im Malteser Krankenhaus St. Franziskus-Hospital in Flensburg

Praxis Dr. med Karola Simoni (Allgemeinmedizin, Kinderheilkunde und Dermatologie) in Costa Calma/ Fuerteventura /Spanien

Thoraxchirurgie Universitätskrankenhaus „Hospital CLINÍC“ in Barcelona/ Spanien

**■ Dissertation/Publikation**

- März 2006 – Februar 2010     Promotionsarbeit bei Prof. Steinhoff in der Experimentellen Herzchirurgie, Rostock.  
Thema: „In vitro Charakterisierung des kardiomyozytären Differenzierungspotentials verschiedener humaner adulter Stammzellen“ – Rigorosum am 09.02.2010
- Juli 2008     Posterpräsentation: „*Transdifferentiation Potential Of CD133<sup>+</sup> Stem Cells*“ (**Oldigs JK**, Ong LL, Ma N and Steinhoff G) „2nd International Congress on Stem Cells and Tissue Formation“ in Dresden 6.-9.07.2008.
- Januar 2010     Publikation: Ong L, Li W, **Oldigs JK**, Kaminski A, Gerstmayer B, Piechaczek C, Wagner W, Li RK, Ma N, Steinhoff G.  
„Hypoxic/normoxic preconditioning increases endothelial differentiation potential of human bone marrow CD133+ cells.“  
Tissue Eng Part C Methods. 2010 Jan 14.

**■ Zusatzqualifikationen**

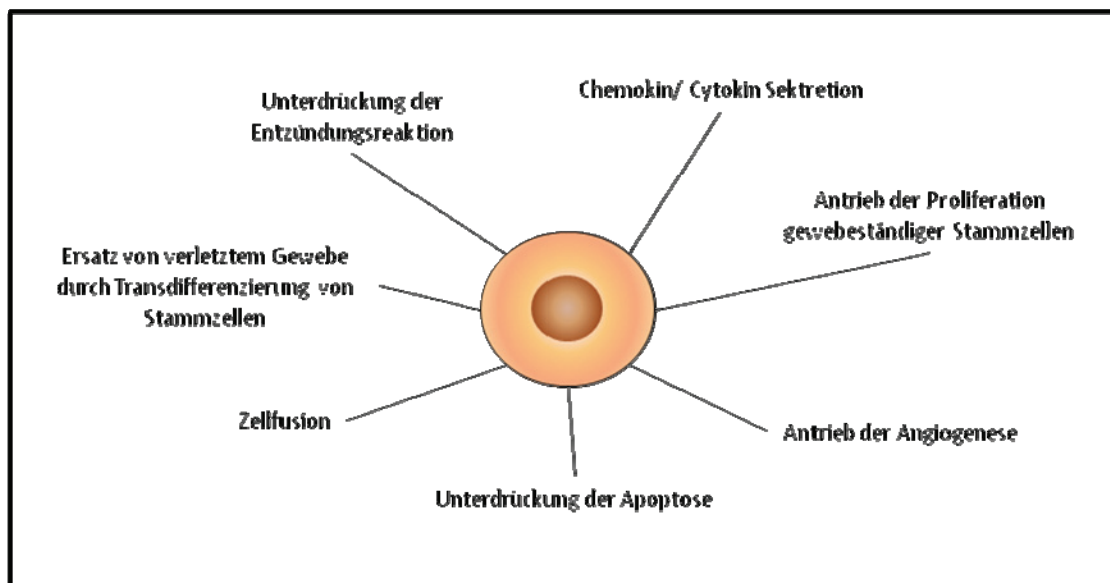
- 2008     Seminar „Praktische EKG-Auswertung“  
2009     Praxisseminar „Erweiterte Maßnahmen der kardiopulmonalen Wiederbelebung“

**■ Sonstiges**

- Sprachkenntnisse:     Englisch: fließend in Schrift und Sprache  
                                  Spanisch: sehr gute Grundkenntnisse (UNICert I)  
                                  Französisch und Latein: gute Grundkenntnisse
- Hobbys:     Handball (in Ober- und Regionalliga)  
                                  Klavierspielen

## Thesen

1. Erkrankungen des Herzkreislaufsystems mit sich oftmals entwickelnder Herzinsuffizienz nach stattgefundenem Myokardinfarkt stellen die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen dar.
2. Stammzellen haben ein hohes therapeutisches Potential zur Wiederherstellung von Gewebe- und Organfunktionen.



Das Potential der Stammzelle. Modifiziert nach [Tögel F., Westenfelder C.; „Adult bone marrow-derived stem cells for organ regeneration and repair.“; Dev Dyn. 2007 Dec;236(12):3321-31. Review.]

3. Im Rahmen dieser Arbeit wurden adulte extrakardiale Stammzellen *in vitro* charakterisiert und modifiziert, um ihr Potential zur kardiomyozytären Differenzierung aufzudecken.

4. Charakteristika der humanen Mesenchymalen Stammzellen sind adhärentes Zellwachstum und fibroblastoide Morphologie auf der Basis einer inhomogenen Stammzellpopulation. Sie sind negativ für CD34 und CD45.
5. Das kardiomyozytäre Differenzierungspotential auf der Basis von *MEF-2C* Proteinexpression von hMSC aus dem Knochenmark wurde mittels 5-Azacytidine-Behandlung nachgewiesen.
6. Charakteristika selektierter humaner CD133 positiver hämatopoetischer Stammzellen sind nicht-adhärentes Wachstum und Positivität für CD34 und CD45.
7. Die kardiomyozytäre Differenzierung der CD133<sup>+</sup> - HSC wurde in einer Ko-Kultivierung mit Maus-Myoblasten mit den Techniken der RT-PCR (*GATA-4*, *NKX2.5*) und der Immunofärbung (*MEF-2C*) nachgewiesen.
8. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die These, dass extrakardiale adulte Stammzellen kardiomyozytäres Differenzierungspotential aufweisen.
9. Die Forschungsergebnisse der Gegenwart zeigen jedoch, dass das kardiomyozytäre Transdifferenzierungspotential nicht der Haupteffekt der Stammzelltherapie mit extrakardialen MSC und HSC bei kardialer Ischämie zu sein scheint. Dies wird hauptsächlich parakrinen Effekten und dem angiogenetisch/vaskulogenetischen Potential dieser Zellen zugesprochen.
10. Die kardiomyozytäre Differenzierungsinduktion von extrakardialen adulten Stammzellen ist ein realistischer Ansatz zur Weiterentwicklung der kardialen Stammzelltherapie.